

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



**Búsqueda de productos naturales actividad antiartrítica a partir
de *Eriodictyon trichocalyx*, planta nativa de Baja California**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias Médicas

PRESENTA:

Lic. Ilse Paola Ortega Muñoz

Directora de tesis: Dra. Ana Laura Martínez Martínez

Co-Directora de tesis: Dra. Araceli Pérez-Vásquez

TIJUANA, B.C., MÉXICO

OCTUBRE, 2024

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (CVU 1158107).

El desarrollo de la parte química se realizó gracias a una estancia en la Facultad de Química-UNAM, y con los siguientes apoyos otorgados a la Dra. Rachel Mata Essayag:

-Proyecto PAPIIT *IN* 203523, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA-UNAM).

-Proyecto CBF2023-2024-385, del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

-Proyecto 5000-9140, del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química de la UNAM.

A la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, por las becas otorgadas para realizar una estancia de investigación de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México y la participación en la 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, AMIPRONAT. Cuernavaca, Morelos, México.

A la Dra. Rachel Mata, responsable del Lab. 124, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por su apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco especialmente a mis tutoras, la Dra. Ana Laura Martínez Martínez y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por guiarme y transmitir sus valiosos conocimientos. Muchas gracias por su dedicación, motivación y confianza. Se han convertido en personas muy valiosas para mí, muchas gracias por todo.

A los miembros de mi jurado, la Dra. Estefanía Ochoa Ruiz, la Dra. Aracely Serrano Medina, el Dr. José De Jesús Manríquez Torres y la Dra. Rachel Mata Essayag,

siendo parte de mi desarrollo, apoyándome con sus observaciones, correcciones y conocimiento.

A la M. en C. Jessica Amacosta Castillo por la asesoría técnica para la obtención y análisis de los resultados por Cromatografía de Gases.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria de la Facultad de Química (USAII-UNAM): Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN.

A mis compañeros de maestría, siempre amables y cálidos.

Un agradecimiento especial a Angie y Horacio, por brindarme no solo un compañero de grado, sino también personas que ahora puedo llamar amigos, los quiero tanto.

Por recibirme con amor, a mis compañeros del laboratorio 124. Por brindarme su apoyo, enseñanza y muchas risas. Los quiero siempre.

A mis papás Fernando y Anabel, por no soltar mi mano y apoyarme en cada paso.

A mis hermanas Marifer, Ana y Sylvia, por el acompañamiento y consejos.

A mi Psicóloga Verónica Sánchez y el Dr. Jesús Sánchez, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A Lupita y Nancy, por su atención y cariño.

A Mariana, Pedro, Sebas, Juani, Jorge, Vipers, Joshuita, Alan, David, Dany, Ale, Jammes, y las Rollers Sureñas por compartir conmigo de alguna u otra manera esta etapa de mi vida, les aprecio a todes.

Contenido

Lista de Tablas	10
Lista de anexos	12
Abreviaturas	17
Resumen.....	19
Abstract	20
Capítulo 1. Introducción.....	21
1.1. Plantas medicinales para la búsqueda de fármacos.....	21
1.2. Etnobotánica	21
1.3. Generalidades de la especie de <i>Eriodictyon trichocalyx</i>	24
1.4. Competencia, herbivoría y metabolitos secundarios.....	27
1.5. Estudios químicos de <i>E. trichocalyx</i>	27
1.6. Artritis reumatoide	29
1.7. Modelo de artritis inducida por colágeno.....	32
1.8. Prueba de formalina para el estudio del dolor.....	33
1.9. Antecedentes	34
1.10. Justificación.....	37
1.11. Objetivo general	41
1.11.1. <i>Objetivos específicos</i>	41
1.12. Hipótesis.....	42
Capítulo 2. Desarrollo experimental.....	43
2.1. Material vegetal	43
2.2. Obtención del extracto acuoso	43
2.3. Procedimientos generales.....	43
2.3.1. <i>Análisis cromatográficos</i>	43
2.3.2. <i>Análisis por cromatografía de gases acoplado a cromatografía de masas</i>	44
2.3.3. <i>Análisis espectroscópicos y espectrométricos.</i>	45
2.4. Estudio químico de la especie <i>E. trichocalyx</i>	46
2.4.1. <i>Fraccionamiento del extracto acuoso de E. trichocalyx</i>	46

2.4.2. Fraccionamiento secundario de la Fracción primaria F5.....	47
2.4.3. Fraccionamiento terciario de la Fracción F5-8	49
2.4.4. Fraccionamiento cuaternario de F5-8-20.....	51
2.4.5. Fraccionamiento secundario de la Fracción F6.....	53
2.4.6. Fraccionamiento secundario de la Fracción F6.....	54
2.4.7. Fraccionamiento terciario de la Fracción secundaria F6-5.....	56
2.5. Preparación del aceite esencial (AE)	57
2.5.1. AE de hojas de <i>E. trichocalyx</i> frescas y secas	57
2.6. Evaluaciones farmacológicas.....	59
2.6.1. Animales.....	59
2.6.2 Obtención del tamaño de la muestra.....	59
2.6.3. Fármacos.....	61
2.6.4. Reactivos.....	62
2.6.5. Disolventes	62
2.6.6. Preparación de las muestras.....	62
2.6.7. Determinación de la toxicidad aguda.....	62
2.6.8. Evaluación de las conductas nociceptivas	63
.....	64
2.6.9. Modelo de artritis inducida por colágeno.....	64
2.7. Análisis estadístico.....	67
.....	69
Capítulo 3. Resultados y discusión	70
3.1. Evaluación de la toxicidad aguda inducida por la decocción de <i>E. trichocalyx</i>	70
3.2. Efecto antinociceptivo de la decocción de <i>E. trichocalyx</i> en la prueba de la formalina en ratones.....	72
3.3. Evaluación del efecto antiartrítico de la decocción de <i>E. trichocalyx</i> en la inflamación en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.....	77
3.3.1. Efecto de la decocción de <i>E. trichocalyx</i> sobre la inflamación en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.	77
3.3.2. Efecto de la decocción de <i>E. trichocalyx</i> sobre la hiperalgesia mecánica en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.	79
3.3.3. Efecto de la decocción de <i>E. trichocalyx</i> sobre la alodinia mecánica en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.	79

3.4. Obtención e Identificación de los productos naturales del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i>	83
3.5. Elucidación estructural de los compuestos 1— 4.....	87
3.6. Obtención de los aceites esenciales y análisis de su composición química	95
Capítulo 5. Conclusiones	100
Perspectivas.....	102
Anexos	103
Literatura citada.....	149

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Eriodictyon trichocalyx</i>	24
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Eriodictyon trichocalyx</i>	25
Figura 3. Factores que contribuyen al desarrollo de la AR. Se consideran los factores ambientales: tabaquismo, obesidad, infecciones microbianas; factores genéticos: modificaciones epigenéticas, polimorfismos genéticos, mutaciones en células T y B, producción de citocinas. Las lesiones sinoviales e hiperplasia de los fibroblastos sinoviales también pueden contribuir. Imagen realizada en BioRender.	30
Figura 4. Expresión de citocinas proinflamatorias, ciclooxigenasa provocando dolor y metaloproteinasas de la matriz desencadena destrucción del cartílago. Fuente: Elaboración propia realizada en BioRender.	33
Figura 5. Cromatograma por CCF de los compuestos puros del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i> . A) Sistema de elución MeOH/CHCl₃ (5:95) y B) Sistema de elución H₂O_{dd}/MeOH/2-propanol/n-butanol (15:10:60:15). Visualización con lámpara UV UV ($\lambda = 254$ nm).....	47
Figura 6. Cromatograma por CCF de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento secundario de F5.....	48
Figura 7. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento terciario de F5-8.	50
Figura 8. Cromatograma por CCDP de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F5-8-20.....	52
Figura 9. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F5-8-20.....	52
Figura 10. Aislamiento del ácido rosmarínico (5), 2,2-dimetil-3 hidroxicromano-6-ácido carboxílico ester metílico (1), 2-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobencofuran-5-carboxilato de metilo (2) y Benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo) (3).....	53
Figura 11. Cromatograma por CCDP del fraccionamiento secundario de la fracción 6.....	54
Figura 12. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento secundario de F6.....	55
Figura 13. Cromatograma por CCDP de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F6-5.	57
Figura 14. Aislamiento del 3-Hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (1), 2-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobencofuran-5-carboxilato de metilo (2), 3-Acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (4) a partir de la fracción F6...	57
Figura 15. CCD de los aceites esenciales preparados con planta fresca (AF1–AF3) y seca (A1–A3) de <i>E. trichocalyx</i> . A: Visualización con lampara de UV a 254 nm; B)	

revelada con el agente cromógeno de anhisaldehído. Fase estacionaria: silica gel 60 F25.....	58
Figura 16. Raton en cilindro Plexiglass. Fuente: Elaboración propia.....	63
Figura 17. Prueba de formalina: Modelo de dolor inflamatorio agudo, en la que el animal presenta conductas relacionadas con dolor espontáneo. Dicho dolor es identificable a simple vista, y se observa a manera de: estremecimiento, levantamiento y lamida de la extremidad (Li <i>et al.</i> , 2018).....	64
Figura 18. Diagrama de flujo del proceso de inmunización en los grupos experimentales.....	65
Figura 19. Puntajes de la evaluación macroscópica del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno. Imagen modificada de Hooke laboratories. Fuente: Elaboración propia.	66
Figura 20. A) Fuerza mecánica aplicada con filamento de Von Frey. B) Medición del URM. C) Medición de la hiperalgesia mecánica con el método PAM. Imagen modificada de Deuis y colaboradores (2017).	68
Figura 21. Diagrama de flujo de la evaluación del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno a partir de la administración de tratamientos.....	69
Figura 22. Curso temporal (0-30 min) del efecto antinociceptivo de <i>E. trichocalyx</i> (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en comparación con el vehículo (s.s). Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6-8 animales.....	73
Figura 23. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de <i>E. trichocalyx</i> (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) expresado como ABC. A) 1ª Fase o neurogénica (0-10 min) y B) 2ª Fase o fase inflamatoria (10-30 min) de la prueba de la formalina en ratones. Cada barra representa el promedio \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.0001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.....	74
Figura 24. Porcentaje de efecto antinociceptivo producido por el extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i> (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en la Fase I de la prueba de formalina en ratones. Las barras verticales representan el porcentaje de efecto antinociceptivo	75
Figura 25. Porcentaje de efecto antinociceptivo producido por el extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i> (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en la Fase II de la prueba de formalina en ratones. Las barras verticales representan el porcentaje de efecto antinociceptivo.	76
Figura 26. Curva dosis-respuesta del efecto de <i>E. trichocalyx</i> en la Fase II de la prueba de la formalina en ratones.	77
Figura 27. Efecto del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i> (316.2 mg/kg, p.o.) sobre la inflamación de las extremidades posteriores en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas. A) Volumen de inflamación de la extremidad posterior derecha y B) Volumen de inflamación de la extremidad posterior izquierda. Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.01$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Boferroni.	78

Figura 28. Efecto del extracto de <i>E. trichocalyx</i> (316.2 mg/kg, p.o.) sobre la hiperalgesia mecánica en las extremidades posteriores en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas. A) Umbral de retiro (g) de la extremidad posterior derecha y B) Umbral de retiro (g) de la extremidad posterior izquierda. Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. * $p < 0.05$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.	80
Figura 29. Efecto del extracto de <i>E. trichocalyx</i> sobre el umbral de retiro mecánico de las extremidades posteriores medido con el filamento electrónico de Von Frey. A) Umbral de retiro mecánico de la extremidad posterior derecha y B) Umbral de retiro mecánico de la extremidad posterior izquierda. . Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de la prueba Bonferroni.	81
Figura 30. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y B) espectro de masas por IE del compuesto 1.....	91
Figura 31. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y B) espectro de masas por IE del compuesto 2.....	91
Figura 32. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y B) espectro de masas por IE del compuesto 3.....	92
Figura 33. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y B) espectro de masas por IE del compuesto 4.....	92
Figura 34. Espectros de RMN de ^1H de los derivados del ácido benzoico (400 MHz, 1–3 están en CD_3OD y 4 en CDCl_3).	93
Figura 35. Espectros de RMN de ^{13}C de los derivados del ácido benzoico (100 MHz, 1–3 están en CD_3OD y 4 en CDCl_3).	93
Figura 36. UHPLC-PDA cromatograma (absorbancia total) del extracto acuoso (decocción) de <i>E. trichocalix</i> . Se presentan los espectros de UV de tres compuestos mayoritarios aislados, dos derivados del benzoico (1, 2) y del ácido rosmarínico (5). Condiciones cromatográficas: ver Parte Experimental.	94
Figura 37. Espectro representativo de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i> . Se muestran en color verde las señales diagnósticas características de los ácidos benzoicos prenilados y en color morado para el ácido rosmarínico.	94
Figura 38. Cromatograma iónico por CG-EM de los aceites esenciales de las hojas frescas (A) y secas (B) de <i>E. trichocalyx</i>	95
Figura 39. Metabolitos hallados en mayor proporción para los AE de hoja fresca y seca de <i>E. trichocalyx</i>	98

Lista de Tablas

Tabla I. Plantas medicinales de uso frecuente en Baja California Norte.....	23
Tabla II. Usos etnobotánicos de <i>E. trichocalyx</i>	26
Tabla III. Compuestos identificados en investigaciones previas de la especie <i>E. trichocalyx</i>	28
Tabla IV. Clasificación de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.....	32
Tabla V. Descripción de los efectos y reducciones patológicas producidas por PN de plantas en pruebas experimentales de artritis.	37
Tabla VI. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i>	46
Tabla VII. Fases móviles utilizadas en el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5.....	48
Tabla VIII. Fracciones reunidas con clave asignada.	48
Tabla IX. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5.....	49
Tabla X. Disolventes utilizados para el análisis cromatográfico de la fracción F5-8 en columna de Sephadex LH-20.	49
Tabla XI. Fracciones reunidas con clave asignada.	50
Tabla XII. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5-8.	51
Tabla XIII. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en CDP de la fracción F6.....	52
Tabla XIV. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en CDP de la fracción F6.....	54
Tabla XV. Fases móviles utilizadas en el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F6.....	55
Tabla XVI. Fracciones reunidas con clave asignada.....	55
Tabla XVII. Fracciones de interés del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F6.....	56

Tabla XVIII. Fracciones obtenidas del fraccionamiento secundario de F6-5 mediante CCDP.....	56
Tabla XIX. Claves y pesos obtenidos de los AE obtenidos de hoja fresca y seca.	58
Tabla XX. Dosis letal media de decocción de <i>E. trichocalyx</i> en diferentes concentraciones.....	71
Tabla XXI. Conductas monitoreadas durante la evaluación de la toxicidad aguda inducida por la decocción de <i>E. trichocalyx</i>	71
Tabla XXII. Porcentaje de antinocicepción obtenido a partir del ABC de las tres dosis administradas del extracto acuoso de <i>E. trichocalyx</i>	73
Tabla XXIII. Fracciones primarias obtenidas a partir de la columna Diaion HP-20.	84
Tabla XXIV. Compuestos aislados del extracto acuoso de <i>Eriodictyon trichocalyx</i>	86
Tabla XXV. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H Y ¹³ C para los compuestos 1-4	90
Tabla XXVI Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	96

Lista de anexos

Figura 40. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del ácido rosmarínico (5) .	103
Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del ácido rosmarínico (5).	103
Figura 42. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).	104
Figura 43. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).	104
Figura 44. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).	105
Figura 45. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 1.....	105
Figura 46. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 1.....	106
Figura 47. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 1.....	106
Figura 48. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 1.....	107
Figura 49. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 1.....	107
Figura 50. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 2.....	108
Figura 51. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 2.....	108
Figura 52. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 2.....	109
Figura 53. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 2.....	109
Figura 54. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 2.....	110
Figura 55. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 3.....	110
Figura 56. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 3.....	111
Figura 57. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 3.....	111
Figura 58. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 3.....	112
Figura 59. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 3.....	112
Figura 60. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 4.....	113

Figura 61. Espectro bidimensional HSQC (CDCl ₃) del derivado prenilado del ácido benzoico 4	113
Figura 62. Espectro bidimensional HMBC (CDCl ₃) del derivado prenilado del ácido benzoico 4	114
Figura 63. Espectro bidimensional COSY (CDCl ₃) del derivado prenilado del ácido benzoico 4	114
Figura 64. Espectro bidimensional NOESY (CDCl ₃) del derivado prenilado del ácido benzoico 4	115
Figura 65. Espectro de masas del compuesto Metil-isobutilcetona detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	115
Figura 66. Espectro de masas del compuesto Tolueno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	116
Figura 67. Espectro de masas del compuesto Tolueno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	116
Figura 68. Espectro de masas del compuesto Etilbenceno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	117
Figura 69. Espectro de masas del compuesto (<i>E</i>)-2-Hexenal detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	117
Figura 70. Espectro de masas del compuesto Hexanol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	118
Figura 71. Espectro de masas del compuesto <i>o</i> -Xileno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	118
Figura 72. Espectro de masas del compuesto <i>o</i> -Xileno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	119
Figura 73. Espectro de masas del compuesto Benzaldehido detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	119
Figura 74. Espectro de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ona detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	120
Figura 75. Espectro de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ona detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	120
Figura 76. Espectro de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	121
Figura 77. Espectro de masas del compuesto Eucaliptol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	121
Figura 78. Espectro de masas del compuesto Alcohol bencílico detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	122
Figura 79. Espectro de masas del compuesto Alcohol bencílico detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	122

Figura 80. Especto de masas del compuesto Fenilacetaldéhidó detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	123
Figura 81. Especto de masas del compuesto Fenilacetaldéhidó detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	123
Figura 82. Especto de masas del compuesto Linalol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	124
Figura 83. Especto de masas del compuesto Linalol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	124
Figura 84. Especto de masas del compuesto 6-Metil-3,5-heptadien-2-ona detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	125
Figura 85. Especto de masas del compuesto Alcohol fenetílico detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	125
Figura 86. Especto de masas del compuesto Alcohol fenetílico detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	126
Figura 87. Especto de masas del compuesto α -Camfolenal detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	126
Figura 88. Especto de masas del compuesto Benzoato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	127
Figura 89. Especto de masas del compuesto Decanal detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	127
Figura 90. Especto de masas del compuesto Dihidrocínamato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	128
Figura 91. Especto de masas del compuesto Propionato de lavandulilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	128
Figura 92. Especto de masas del compuesto (Z)-Ácido cinámico, etil ester detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM. .	129
Figura 93. Especto de masas del compuesto α -Copaeno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	129
Figura 94. Especto de masas del compuesto Isobutirato de lavandulilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	130
Figura 95. Especto de masas del compuesto β -cariofileno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	130
Figura 96. Especto de masas del compuesto Geranil-acetona detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	131
Figura 97. Especto de masas del compuesto γ -Elemeno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	131
Figura 98. Especto de masas del compuesto Cinamato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	132

Figura 99. Especto de masas del compuesto α -Selineno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	132
Figura 100. Especto de masas del compuesto γ -Cadineno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	133
Figura 101. Especto de masas del compuesto α -muuroleno detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	133
Figura 102. Especto de masas del compuesto δ -Cadineno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	134
Figura 103. Especto de masas del compuesto 10- <i>epi</i> -Elemol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	134
Figura 104. Especto de masas del compuesto Nerolidol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	135
Figura 105. Especto de masas del compuesto Elemol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	135
Figura 106. Especto de masas del compuesto Oxido de cariofileno detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	136
Figura 107. Especto de masas del compuesto Espatulenol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	136
Figura 108. Especto de masas del compuesto Espatulenol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	137
Figura 109. Especto de masas del compuesto β -Muurolo-4,10(14)-dien-1-ol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	137
Figura 110. Especto de masas del compuesto Óxido de humeleno II detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	138
Figura 111. Especto de masas del compuesto γ -Eudesmol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	138
Figura 112. Especto de masas del compuesto γ -Eudesmol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	139
Figura 113. Especto de masas del compuesto τ -Cadinol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	139
Figura 114. Especto de masas del compuesto τ -Cadinol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	140
Figura 115. Especto de masas del compuesto α -Eudesmol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	140
Figura 116. Especto de masas del compuesto α -Eudesmol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	141
Figura 117. Especto de masas del compuesto 2,3-Dihidrofarnesol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	141

Figura 118. Especto de masas del compuesto 2,3-Dihidrofarnesol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	142
Figura 119. Especto de masas del compuesto (<i>E,E</i>)-Farnesal detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	142
Figura 120. Especto de masas del compuesto Farnesol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	143
Figura 121. Especto de masas del compuesto Farnesol detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	143
Figura 122. Especto de masas del compuesto (<i>2E,6E</i>)-Metil farnesoate detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	144
Figura 123. Especto de masas del compuesto Benzoato de bencilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	144
Figura 124. Especto de masas del compuesto Benzoato de bencilo detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	145
Figura 125. Especto de masas del compuesto Criptomeridiol detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.....	145
Figura 126. Especto de masas del compuesto Acetato de dihidrofarnesilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	146
Figura 127. Especto de masas del compuesto Acetato de dihidrofarnesilo detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	146
Figura 128. Especto de masas del compuesto Ácido farnesoico detectado en el aceite esencial de planta fresca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	147
Figura 129. Especto de masas del compuesto Acetato de farnesilo detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	147
Figura 130. Especto de masas del compuesto <i>cis</i> -Cinnamate de bencilo detectado en el aceite esencial de planta seca de <i>E. trichocalyx</i> por CG-EM.	148

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
AE	Aceite esencial
AIC	Artritis inducida por colágeno
AR	Artritis reumatoide
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH_2Cl_2	Diclorometano
$CHCl_3$	Cloroformo
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina
COSY	Espectroscopía de correlación
DL_{50}	Dosis letal media
EEM	Error estándar de medida
EM	Espectros de masas
eV	Electrón-Voltios
ESI	Ionización por electrospray
FARME	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
G	Gramos
HMBC	Espectroscopía de Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples
HSQC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de un Único Cuanto
H_2O_{dd}	Agua deuterada
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
IE	Impacto electrónico
IMMS	Organización Mundial de la Salud
IR	Espectroscopía de infrarrojo
I_R	Índice de Retención de Kovats
ISSSTE	Productos naturales
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	El Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
kg	Kilogramos
L	Litro
MeOH	Metanol
NaCl	Cloruro de sodio

NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
µm	Micrómetro
M	Metro
mm	Milímetro
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanómetros
NOESY	Espectroscopía Nuclear del Efecto Overhauser
NI	No inmunizadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PN	Productos naturales
p.o.	Administración oral
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s.c.	Subcutánea
s.s.	Solución salina
UHPLC	Ultra-High Pressure Liquid Chromatograph
URM	Umbral de retiro mecánico
UV	Ultravioleta
PAM	Pressure Application Measurement
PN	Productos naturales
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria
UV	Ultravioleta
VEH	Vehículo

Resumen

El presente estudio pretende contribuir a una mejor comprensión de los efectos farmacológicos de *E. trichocalyx*, una planta medicinal utilizada por los el pueblo indígena Kumiai. Particularmente sobre sus efectos antiinflamatorio, antinociceptivo y antihiperalgésico como potencial para el tratamiento de la artritis reumatoide, utilizando el modelo de artritis inducida (AIC) por colágeno en ratas y la prueba de la formalina en ratones. Así como también, describir las características fitoquímicas de la especie. Adicionalmente, se determinó la dosis letal media para establecer la seguridad de la decocción. Los resultados indican que la decocción no produce toxicidad, obteniendo una $DL_{50} > 5.000$ mg/kg. Los ensayos de actividad biológica mostraron que la decocción produce un efecto antinociceptivo significativo en la prueba de formalina en ratones. Sin embargo, no produce efecto antiinflamatorio, antialodínico y antihiperalgésico en el modelo de AIC en ratas. Por otro lado, se aislaron cinco metabolitos secundarios principales de *E. trichocalyx*. El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos confirmó su estructura como 3-hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**1**), 2-(2-hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (**2**), benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo) (**3**), 3-acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**4**) y ácido rosmarínico (**5**). Los aceites esenciales de las hojas de la planta fresca y seca se obtuvieron por hidrodestilación y se analizaron mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Se determinaron veintisiete y treinta y ocho componentes en los aceites esenciales de las muestras secas y frescas, respectivamente. Los principales componentes de los aceites esenciales de las partes aéreas frescas y secas fueron el α -eudesmol (14.72% y 3.99%), el 2,3-dihidrofarnesol (10.43% y 24.73%), el farnesol (3.12% y 10.47%), γ -eudesmol (3.62% y 0.4015) y el acetato de dihidrofarnesilo (4.13% y 5.8%) respectivamente. Para el aceite esencial fresco se detectó también el elemol (3.54%). De manera general, en este trabajo se presenta la primera caracterización del volatilo de *E. trichocalyx* y la primera exploración de sus efectos antiinflamatorios, antinociceptivos y antihiperalgésicos, promoviendo así su uso racional en la medicina alternativa de México.

Abstract

This study aims to contribute on a better understanding of the pharmacological effects of *E. trichocalyx*, a medicinal plant used by the Kumiai indigenous people. Particularly, on its anti-inflammatory, antinociceptive and antihyperalgesic effects as potential to treat rheumatoid arthritis by the rat collagen-induced arthritis model (CIA) and the formalin test. As well as describe the phytochemical characteristics of the specie. Additionally, it was determinate the lethal dose to establish the decoction safety. The results indicate that the decoction de *E. trichocalyx* does not produce toxicity, obtaining a LD₅₀ > 5,000 mg/kg. The biological activity results shown that the decoction exhibits a significant antinociceptive effects in the formalin test in mice. However, decoction did not show anti-inflammatory, antiallodynic and antihyperalgesic effects in the collagen-induced arthritis rat model. In addition, five major metabolites were isolated from *E. trichocalyx*. The analysis of their spectroscopic and spectrometric data confirmed their structure as 2,2-dimethyl-3-hydroxychromane-6-carboxylic (**1**), methyl-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylate (**2**), 4-hydroxy-3-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-benzoic acid methyl ester (**3**), 2,2-dimethyl-3-acetoxychroman-6-carboxylic acid (**4**) and rosmarinic acid (**5**). Furthermore, the essential oils of fresh and dried aerial parts of the specie were obtained through hydro-distillation and were analyzed using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Respectively, twenty-seven and thirty-eight components were determined in essential oils of the dried and fresh samples. The main components in essential oils of fresh and dried *E. trichocalyx* aerial parts were α -eudesmol (14.72% y 3.99%), 2,3-dihydrofarnesol (10.43% y 24.73%), farnesol (3.12% y 10.47%), γ -eudesmol (3.62% y 0.4015) and dihydrofarnesyl acetate (4.13% y 5.8%) respectively. For the fresh essential oil, elemol (3.54%) was also detected. Overall, here we provide the first characterization of the volatilome of *E. trichocalyx*, and the *Eriodictyon* genus, as well as the first exploration of its anti-inflammatory, antinociceptive and antihyperalgesic effects. Thus, promoting the rational use of *E. trichocalyx* in Mexican alternative medicine.

Capítulo 1. Introducción

1.1. Plantas medicinales para la búsqueda de fármacos

El uso de plantas medicinales para mantener un buen estado de salud es una práctica que se ha desarrollado desde tiempos ancestrales. Este entendimiento acerca de las propiedades curativas y del uso de las plantas se ha transmitido por generaciones a manera de registros escritos y orales, generando conocimientos empíricos que resultan en no solo el tratamiento de enfermedades, sino que también en su prevención.

Matos Miranda (2020) menciona que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un porcentaje mayor al 65% de la población de los países en desarrollo han incorporado el uso de plantas medicinales para tratar enfermedades. A parte de que el mercado de los productos naturales derivados de plantas ha ido en incremento. Los productos naturales (PN) son moléculas biológicas que se encuentran generalmente en pequeñas cantidades en algas, plantas, hongos y bacterias. Han desempeñado un papel importante en el desarrollo de medicamentos y han sido utilizados para tratar diversas enfermedades en la mayoría de las culturas. Los PN más estudiados y utilizados, son los derivados de las plantas. Con los avances de la química en el siglo XIX fue posible examinar los componentes de las plantas, identificar su bioactividad y comprender sus mecanismos de acción (Beutler, 2019; Atanasov *et al.*, 2021).

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo (10-12%). Se estima que en México existen alrededor de 31,000 especies diferentes de plantas vasculares, de las que aproximadamente 3,350 tienen efectos medicinales (Mata *et al.*, 2019). La herbolaria en México data de la época prehispánica; actualmente su uso es común en poblaciones rurales e indígenas no solo por arraigo sociocultural, sino también acceso limitado a las instituciones de salud pública. En años recientes su uso se ha retomado en poblaciones urbanas. A pesar de los esfuerzos que han realizado diferentes grupos de investigación y autoridades sanitarias, solo un pequeño grupo de plantas medicinales se han

estudiado desde el punto de vista farmacológico, fitoquímico, toxicológico y farmacocinético (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

1.2. Etnobotánica

El campo de investigación etnobotánico tiene como objetivo el entender las interacciones entre humanos y plantas y sus efectos culturales, evolutivos y ecológicos a lo largo de la historia. Lo anterior con la intención de un mejor manejo de recursos y establecer estrategias convenientes para manejar los problemas ambientales que se distinguen dentro de la crisis socioecológica global. La etnobotánica también busca construir marcos tanto teóricos como metodológicos en donde se englobe la experiencia botánica de comunidades locales a lo largo de todo el mundo, en donde se instauren los conocimientos y técnicas de manejo de plantas como una base sostenible de interacciones bioculturales (Casas *et al.*, 2023). Debido a la gran diversidad biocultural que presenta México, este ha logrado construir un gran conocimiento etnobotánico con una basta domesticación de plantas, en donde se reportan los usos por parte de culturas indígenas y comunidades rurales de aproximadamente 6500 especies de plantas nativas de México. Caballero y colaboradores (2022) menciona también que Baja California es uno de los estados que requiere mayores esfuerzos enfocados en los registros etnobotánicos; al ordenar los 32 estados de acuerdo al número de registros etnobotánicos que presentan, Baja California se posicionó en el número 29 con un total de 163 registros, en contraste con Puebla (posición número 1) con un total de 10,575 registros. Es por esto que surge la necesidad de fortalecer la investigación científica enfocada en el uso de plantas endémicas de Baja California.

Continuando con los registros etnobotánicos de B.C., Winkelman (1986) realiza la primera y única identificación de plantas medicinales que se utilizan con mayor frecuencia en Baja California Norte (**Tabla I**). La mayoría de estas especies ya cuentan con estudios y ensayos biológicos. En esta investigación B.C. Winkelman no incluyó a la especie *Eriodictyon trichocalyx*, a pesar de ser una especie nativa de Las Californias y de que su actividad biológica estaba reportada. Esta especie hablando de manera general, cuenta con pocos estudios fitoquímicos,

sin embargo algunos autores (Bohm y Constant, 1990; Maher *et al.*, 2020) encontraron compuestos con propiedades que podrían tener un efecto sobre los cambios morfológicos que genera a la artritis reumatoide, enfermedad de interés para el presente estudio.

La OMS define a la medicina herbal como una práctica que incluye hierbas, materiales herbales, preparaciones herbales y el producto herbal final, que contiene como ingrediente activo partes de plantas como: hojas, tallos, flor, raíces y semillas. La medicina herbal juega un papel importante en el sistema de atención de salud en muchos países de Asia, África y Europa, y cada vez existe un mayor número de países que comienzan a utilizar la medicina herbal en nuevas tecnologías médicas. Actualmente el 25% de los medicamentos utilizados son de origen vegetal (Iwanowicz-Palus *et al.*, 2019). Los productos naturales que se pueden obtener de las plantas a través de los conocimientos etnobotánicos son una fuente de fármacos potenciales por gran bioactividad química. Los estudios etnofarmacológicos son de gran importancia para el desarrollo de medicinas herbales y a pesar de que el uso de medicina herbal ha ido en aumento, los estudios dentro de este campo de investigación permanecen dentro de esfuerzos académicos primarios realizados principalmente por instituciones académicas. Lo anterior dispone de un amplio potencial de estudio para una mejor comprensión de la producción de fitofármacos eficaces.

Tabla I. Plantas medicinales de uso frecuente en Baja California Norte.

Plantas medicinales	
<i>Agastache mexicana</i>	<i>Montanoa tomentosa</i>
<i>Arctostaphylos cf. pungens</i>	<i>Passiflora sp.</i>
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Peumus boldus</i>
<i>Borago officinalis</i>	<i>Quassia amara</i>
<i>Buddleja perfoliata</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Equisetum spp.</i>	<i>Ruta graveolens</i>
<i>Eucalyptus aff. fibrosa</i>	<i>Selaginella lepidophylla</i>
<i>Gnaphalium sp.</i>	<i>Senna sp.</i>
<i>Heterotheca inuloides</i>	<i>Tecoma cf. stans</i>
<i>Hintonia latiflora</i>	<i>Turnera diffusa</i>
<i>Larrea tridentata</i>	<i>Valeriana sp.</i>

Fuente: Elaboración propia con base en Winkelman (1986).

1.3. Generalidades de la especie de *Eriodictyon trichocalyx*

La especie *Eriodictyon trichocalyx* (**Figura 1**), también conocida como Yerba santa; es un arbusto leñoso y policárpico con hojas perennes. Tiene una distribución intermedia, hallándose en taludes y aluviales; en chaparrales, matorrales y bosques de pinos. En suelos rocosos, arenosos y en grava. Habita en climas mediterráneos, con inviernos fríos y húmedos y veranos calurosos y secos. Desde el suroeste de California hasta Baja California (**Figura 2**). Esta especie mide entre los 0.5 a 2 m de altura, con hojas de 5 a 15 cm de largo, de forma peciolada y color verde oscuro. Sus flores miden entre 6 a 8 mm de largo, de color blanco a lavanda, cubiertas de pelos (Montalvo *et al.*, 2017).



Figura 1. *Eriodictyon trichocalyx*.

Taxonomía

División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Boraginales
Familia	Boraginaceae
Género	<i>Eriodictyon</i>
Especie	<i>Eriodictyon trichocalyx</i> (Heller, 1904)



Figura 2. Distribución geográfica de *Eriodictyon trichocalyx*.

Fuente: Royal Botanic Gardens, Kew.

Eriodictyon trichocalyx también tiene importancia ecológica, siendo un recurso valioso para polinizadores, como abejas, avispas y mariposas. Esta planta tiene diversos usos: 1) Control erosivo, siendo apropiada para usar en hábitats aluviales perturbados, ya que crece rápido y se recupera fácilmente de la perturbación, 2) Restauración de hábitats, específicamente en el hábitat de matorral aluvial, 3) Horticultura, principalmente en los jardines de abejas y mariposas, ya que atrae a muchas especies importantes para la polinización, 4) Etnobotánicos por sus propiedades medicinales, ya que es utilizada para tratar problemas pulmonares, el alivio del dolor, detener el sangrado y se han descrito propiedades tanto antibacterianas como antiinflamatorias (Maher *et al.*, 2020; Montalvo *et al.*, 2017; Bohm y Constant, 1990).

Al retomar los registros etnobotánicos existentes en B.C., encontramos un único registro (Winkelman, 2012) que menciona a *E. trichocalyx* como fuente de medicina herbal para un pueblo indígena, los Kumiai. Este grupo indígena se distribuye a lo largo de Las Californias y han utilizado esta especie para tratar diversas afecciones como *resfriados*, congestión, dolor de garganta, así como también para tratar dolores y molestias.

La parte de la planta a utilizar va a depender del tipo de dolencia que se busca tratar (Tabla II). Dentro de estas afecciones encontramos articulaciones doloridas las cuales eran tratadas al aplicar las hojas de la especie en forma de cataplasma sobre el área afectada y también se utilizaba en forma de decocción

(Wilken, 2012). Este uso tradicional abre una ventana de oportunidad para la identificación de su aplicación farmacológica, específicamente en la farmacología básica del dolor. Al enfocarnos en sus estudios previos, observamos que los metabolitos secundarios aislados tienen reportes de actividad que les otorga un elevado valor farmacológico. Maher y colaboradores (2020) y Wang y colaboradores (2023), mencionan que la especie tiene un alto contenido del flavonoide esterubina, el cual es un potente antiinflamatorio, así como también presenta protección contra la ferroptosis y oxitosis (características relacionadas a la artritis reumatoide). Otro flavonoide aislado fue la eriodictiol, el cual fue capaz de desplazar la unión de [(3)H]-resiniferatoxina e inhibir el influjo de calcio mediada por capsaicina, sugiriendo que el eriodictiol actúa como un antagonista TRPV1 (Rossato et al., 2011). Otros compuestos aislados de esta especie (Bohm y Constant, 1990) son la naringenina con efecto analgésico y antiinflamatorio, modulando canales de potencial receptor transitorio, desencadenando la vía analgésica del canal K⁺, reduciendo también el reclutamiento de leucocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias (Manchope y colaboradores, 2022). La apigenina, con reportes de actividad antinociceptiva y de reducción de niveles de (TNF- α y IL-1 β) (Wenji y colaboradores, 2023) y la luteolina, donde se ha demostrado en varios estudios, sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, con beneficios prometedores para el tratamiento del dolor (Ntalouka y Tsrivakou, 2023). Lo anterior, nos permite inferir que la especie tiene reportes de uso tradicional sobre padecimientos como las articulaciones doloridas debido a su diversa cantidad de metabolitos con efectos farmacológicos que interfieren en los procesos en la producción del dolor.

Tabla II. Usos etnobotánicos de *E. trichocalyx*

Afección	Parte de planta	Forma de consumo
Trastorno respiratorio	Hojas	Infusión en agua
Resfriado	Hojas y tallos	Infusión en agua
Dolor de pecho	Hojas	Presionar directamente sobre el pecho
Articulaciones doloridas	Holas	En forma de cataplasma sobre el área afectada o decocción

Garganta seca	Hojas	Hoja cruda masticada
Disminuir sangrado	Holas	Presionar de forma curda o cocida sobre la herida

Fuente: Elaboración propia con base en Winkelman (2012).

1.4. Competencia, herbivoría y metabolitos secundarios

Los PN pueden referirse a los metabolitos secundarios, por ejemplo: saponinas, compuestos fenólicos, carotenoides, alcaloides, terpenos, entre otros. Estos no son esenciales para el crecimiento y reproducción del organismo, sin embargo conceden protección contra la herbivoría e infecciones bacterianas, también actúan como atrayentes para polinizadores y animales para la dispersión de sus semillas y agentes alelopáticos. Estas funciones permiten la supervivencia de las plantas (Sorokina y Steinbeck, 2020).

Eriodictyon trichocalyx es una buena competidora ecológica, al madurar es capaz de crecer lateralmente y puede llegar a convertirse en una planta dominante. También tiene una baja palatabilidad y suele crecer en zonas donde hay plantas que son más pastoreadas por herbívoros. Examinando la química de la superficie de las hojas de esta especie. Se encontró que contienen flavonoides, los cuales actúan como defensa química contra la herbivoría (Montalvo *et al.*, 2017).

1.5. Estudios químicos de *E. trichocalyx*

Extractos obtenidos a partir de *E. trichocalyx* fueron investigados previamente por tres autores: Bohm y Constant (1990), Maher y colaboradores (2020) y Wang y colaboradores (2023). Quienes identificaron 10, 3 y 12 compuestos respectivamente (**Tabla III**). Bohm y Constant (1990) aislaron 10 compuestos a partir de un extracto de CH₂Cl₂; el estudio cromatográfico se realizó en columna Polyclar AT eluyendo con CH₂Cl₂-MeOH 3:1 y posteriormente aumentando la proporción de MeOH en la mezcla de elución. Por último, los compuestos fueron identificados por medio de análisis UV y MS, reacciones de color con difenil-ácido bórico-etanolamina y perfiles cromatográficos utilizando estándares. Maher y

colaboradores (2020) aislaron 3 compuestos a partir de un extracto de CH₂Cl₂; los compuestos fueron identificados por medio de espectrometría de masas utilizando el método de monitoreo de reacción múltiple. Wang y colaboradores (2023) aislaron los 12 compuestos a partir de un extracto realizado con MeOH, el análisis cromatográfico se realizó con UHPLC utilizando una columna Agilent Poroshell EC-C₁₈ con fase móvil de H₂O y acetonitrilo (ambos con ácido fórmico 0.1%) 8:2 disminuyendo la concentración de H₂O hasta llegar 0:10. Por último, los compuestos fueron identificados por medio de análisis MS. Toda las investigaciones destacan a los flavonoides como los compuestos principales, con presencia también de otro tipo de polifenoles como el ácido melítrico y el ácido rosmarínico. Es importante mencionar que no solo son escasos los estudios químicos de *E. trichocalyx*, sino que también en esta investigación se trabajó por primera vez con el estudio fitoquímico del extracto acuoso de la especie; utilizando un método de extracción de tipo decocción. Esto para poder replicar el uso tradicional que le dan los Kumiai a la planta y así poder promover su uso racional en la medicina alternativa.

Los aceites esenciales son compuestos volátiles que se obtienen a partir de diversas partes de la planta y pueden ser extraídos a partir de distintas técnicas. Los aceites esenciales son de gran importancia ya que estos presentan diversas actividades biológicas, como antioxidante, antimicrobianas y también efectos sobre patologías de dolor; representando también un aspecto importante en la medicina tradicional a lo largo de la historia (Irshad, et al., 2020). A pesar de la importancia de los aceites esenciales y lo interesante que pueden resultar los reportes de la actividad biológica de la especie, ésta hasta el momento, no cuenta con análisis de los componentes presentes en su aceite esencial.

Tabla III. Compuestos identificados en investigaciones previas de la especie *E. trichocalyx*.

Compuestos	Bohm y Constant (1990)	Maher y colaboradores (2020)	Wang y colaboradores (2023)
Naringenina	+		+

Eriodictiol	+	+	+
Eriodictiol 3'-metil éter	+		
Apigenina	+		
6-metoxiapigenina	+		
Luteolina	+		
Crisoeriol	+		
Luteolin 3',7-dimetil éter	+		
6-Metoxiluteolina	+		
Isorhamnetina	+		
Esterubina		+	+
Homoeriodictiol		+	+
Ácido rosmarínico			+
Ácido melítrico			+
6-metoxinaringenina			+
Hispidulina			+
Jaceosidina			+
Hesperetina			+
Pinocembrina			+
Sakuranetina			+

1.6. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, inflamatoria autoinmune progresiva, crónica y deformante de las articulaciones. Puede ocurrir a cualquier edad, aunque el pico de incidencia se presenta en la tercera edad y es una de las enfermedades inflamatorias crónicas con una prevalencia a nivel mundial de 5 por cada 1000 adultos (Aletaha y Smolen, 2018).

La causa de la AR permanece desconocida, aunque se han identificado factores genéticos y ambientales que contribuyen a su desarrollo (**Figura 3**). Se propone que el establecimiento inicial se da a partir de dos eventos: 1) una predisposición genética que genera células T y B autorreactivas, y 2) un evento desencadenante como infecciones virales o bacteriana o daño tisular proporcionando células presentadoras de antígeno (APC) activadas que a su vez activan a los linfocitos

autorreactivos generados previamente. Lo anterior resulta en una tolerancia interrumpida y en la destrucción de tejidos/órganos. Existen también factores de riesgo para el desarrollo de AR entre ellos obesidad, tabaquismo, hormonas sexuales, enfermedad periodontal, cambios en el microbioma del intestino, exposición a la luz UV (Lin *et al.*, 2020).

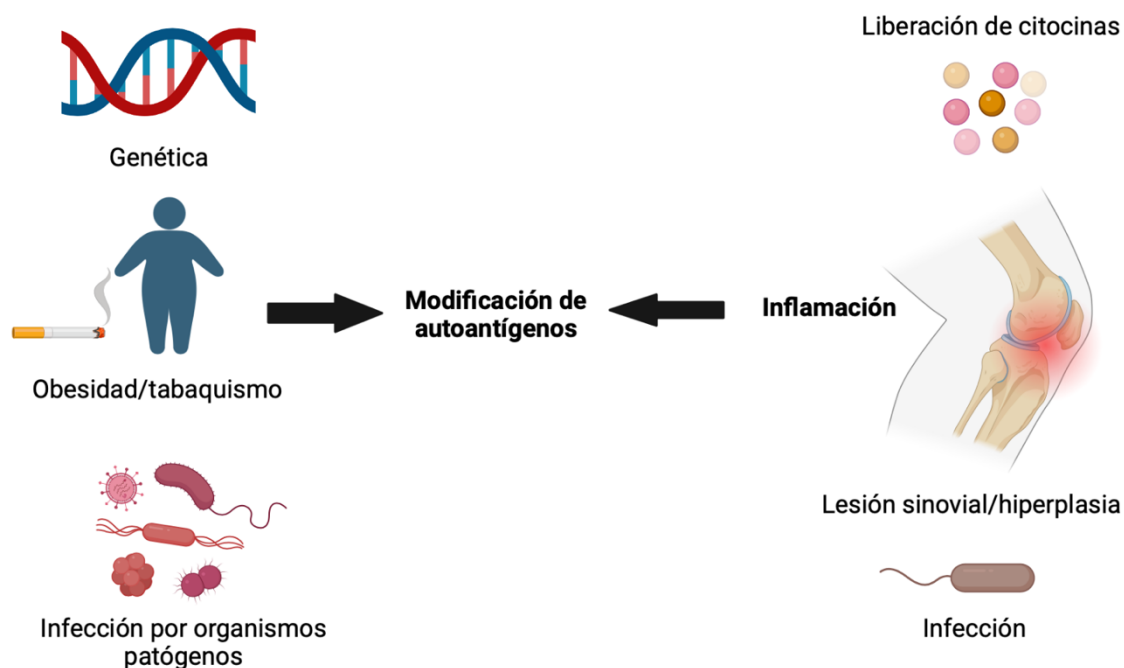


Figura 3. Factores que contribuyen al desarrollo de la AR. Se consideran los factores ambientales: tabaquismo, obesidad, infecciones microbianas; factores genéticos: modificaciones epigenéticas, polimorfismos genéticos, mutaciones en células T y B, producción de citocinas. Las lesiones sinoviales e hiperplasia de los fibroblastos sinoviales también pueden contribuir. Imagen realizada en BioRender.

Los síntomas presentes en la etapa inicial de la AR, se caracterizan por: fatiga, inflamación y sensibilidad articular, rigidez matutina, sensación de gripe, niveles elevados de proteína C reactiva y aumento en la velocidad de sedimentación globular. En las etapas posteriores de la enfermedad, si la AR no es tratada de manera efectiva, los síntomas generan cuadros clínicos con mayor complejidad: derrames pleurales, nódulos pulmonares, linfomas, anomalías hematológicas, vasculitis en arterias, desalineación de articulaciones, erosión ósea, destrucción de cartílago y de nódulos reumáticos y pérdida de movimiento (Lin *et al.*, 2020).

La AR se caracteriza por la inflamación crónica de la membrana sinovial, la cual puede destruir el cartílago articular y el hueso yuxtaarticular, este daño se da de manera paulatina y si no se trata oportuna y adecuadamente, puede llegar a ocurrir daño extraarticular en diferentes órganos: corazón, riñones, pulmones, ojos, sistema digestivo y nervioso y la piel (Radu y Bungau, 2021). Las consecuencias incapacitantes de la AR a corto y largo plazo incluyen dolor e inflamación de las articulaciones de las manos y pies. Estas manifestaciones suelen acompañarse de rigidez articular matutina que puede llegar a durar varias horas. Además, los pacientes sufren daño articular irreversible que conduce a la discapacidad y disminución de la calidad y esperanza de vida (Aletaha y Smolen, 2018).

Actualmente existen diversos tratamientos para la AR, aunque permanece como un desafío el encontrar tratamientos que coincidan con las manifestaciones y evolución de la enfermedad del paciente, para lograr una remisión sostenida. Además otro problema es el difícil acceso a la atención y manejo médico (Solomon y Rudin, 2020). Una vez que la AR es diagnosticada, el objetivo del tratamiento es lograr la remisión total o el reducir significativamente la actividad de la enfermedad. Lo anterior en un lapso de seis meses para lograr prevenir la discapacidad, daño articular y las manifestaciones sistémicas de la AR. El tratamiento debe ser inmediato y continuo con frecuentes evaluaciones para cerciorarse de utilizar la estrategia de tratamiento adecuada.

En la actualidad, los enfoques terapéuticos modernos de la AR involucran a los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) (**Tabla IV**), estos son medicamentos que interfieren con los signos y síntomas de la AR, inhibiendo la progresión del daño articular (Aletaha y Smolen, 2018; Lin *et al.*, 2020). Existen tratamientos convencionales como: A) analgésicos antiinflamatorios no esteroideos; que incluyen inhibidores selectivos de la COX-2. Estos reducen síntomas y signos como lo es el dolor, inflamación y mejoran el funcionamiento de las articulaciones; pero no tienen un efecto en su evolución o pronóstico. Algunos ejemplos son: aspirina, diclofenaco, ibuprofeno. B) antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides), como la prednisona, mejoran signos y síntomas de la enfermedad y disminuyen la progresión del daño, aunque su uso se limita por los

efectos adversos que surgen del uso crónico (Lin *et al.*, 2020). El tratamiento con medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o analgésicos, deben usarse únicamente como terapia adyuvante, ya que su eficacia es limitada y provoca con frecuencia destrucción articular, discapacidad y aumento de mortalidad (Aletaha y Smolen, 2018). El tratamiento farmacológico debe de complementarse con fisioterapia para mantener la movilidad articular y asesoramiento al paciente para el retraso de la progresión de la enfermedad. Es necesario una mayor investigación para la búsqueda de mejores alternativas farmacológicas, para alcanzar una mayor eficacia y perfiles de seguridad en los tratamientos, así como menores costos financieros para los pacientes.

Tabla IV. Clasificación de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

Clasificación de FARME			
FARME	Agentes sintéticos convencionales	Agentes sintéticos dirigidos	Agentes biológicos
Ejemplos	<ul style="list-style-type: none"> ⊛ Metotrexato ⊛ Hidroxicloroquina ⊛ Sulfadiazina 	Inhibidores: <ul style="list-style-type: none"> ⊛ Pan-JAK ⊛ JAK1/2 	Inhibidores: <ul style="list-style-type: none"> ⊛ TNF-α ⊛ TNF-receptor ⊛ IL-6 ⊛ IL-6R ⊛ moléculas coestimuladoras <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ⊛ Terapia dirigida a las células B

Fuente: Elaboración propia con base en Lin y colaboradores (2020). Pan-JAK y JAK 1/2: Vías de señalización. TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, proteína que interviene en la inflamación, la apoptosis y la destrucción articular. TNF-receptor: Receptor del factor de necrosis tumoral. IL-6: Interleucina-6, citocina con actividad inflamatoria y proinflamatoria. IL-6R: Receptor de interleucina 6.

1.7. Modelo de artritis inducida por colágeno

El modelo consiste en la inmunización de las ratas Wistar con colágeno tipo II derivado de cartílago, el cual induce artritis experimental en las extremidades anteriores y posteriores de las ratas tratadas (**Figura 4**) (Trentham *et al.*, 1977). En

este modelo se producen muchas características morfológicas similares a las que se presentan en la artritis reumatoide en humanos, en particular sinovitis, formación de pannus y erosión del cartílago articular y del hueso. Así mismo, este modelo experimental comparte muchos factores biológicos con la artritis reumatoide, específicamente las citocinas (TNF- α , IL-1 β and IL-6) presentes en la membrana sinovial y en el cartílago (Teixeira *et al.*, 2019).

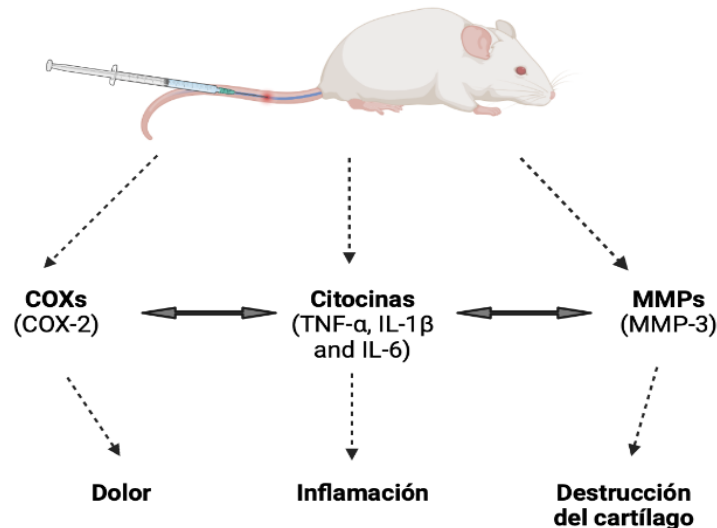


Figura 4. Expresión de citocinas proinflamatorias, ciclooxigenasa provocando dolor y metaloproteinasas de la matriz desencadena destrucción del cartílago. Fuente: Elaboración propia realizada en BioRender. COX-2: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2. TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, proteína que interviene en la inflamación, la apoptosis y la destrucción articular. IL-1 β : Interleucina 1 beta es citocina activadora de linfocitos. IL-6: Interleucina-6, citocina con actividad inflamatoria y proinflamatoria. MMP-3: Estromelisin-1, enzima que participa en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular.

1.8. Prueba de formalina para el estudio del dolor

La Asociación Internacional para el estudio del dolor define al dolor como: “Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial”. El dolor es un mecanismo fisiológico de defensa que notifica al cuerpo la presencia de estímulos nocivos y promueve la reparación (Solano y Villalobos, 2022). Existen cuatro tipos de dolor: inflamatorio, neuropático, funcional y nociceptivo. Este último, se describe como una sensación fisiológica vital en donde el nociceptor (neurona sensorial primaria) se ve activada por estímulos dañinos o potencialmente dañinos, que producen sensación de dolor (Guerrero-Solano y Flores-Bazán, (2022).

La prueba de la formalina evalúa la respuesta del animal ante un estímulo doloroso de tipo moderado, continuo y generado por daño tisular, aproximándose al tipo de dolor clínico. El efecto antinociceptivo en este proyecto se determinó mediante la prueba de la formalina. Este es un modelo experimental ampliamente aceptado como un modelo químico para inducir dolor inflamatorio. La inyección de formalina diluida en la extremidad posterior de las ratas produce una respuesta nociceptiva bifásica dosis-dependiente que consta de un componente inmediato (primera fase) y un componente tónico (segunda fase). El comportamiento evocado en la prueba de la formalina es útil porque puede proporcionar una idea del procesamiento de la información sensorial a nivel periférico y a nivel de la médula espinal. La conducta generada en la primera fase representa la activación de todo tipo de fibras aferentes primarias en el sitio de la inyección. Mientras que la actividad conductual en la segunda fase requiere de la participación de la periferia y es acompañada por la liberación de mediadores inflamatorios en la médula espinal (McNamara *et al.*, 2007).

1.9. Antecedentes

Se hallan diversas investigaciones que enfocan sus estudios a los PN de las plantas y su aplicación potencial en la industria de la salud. Las especies vegetales han actuado como la fuente principal de medicamentos para el tratamiento de múltiples enfermedades por milenios. Estos usos botánicos han evolucionado y se han transformado en objeto de estudio científico.

En la revisión presentada por Mesa-Vanegas (2017) se destaca cómo a pesar del avance científico, en donde se han desarrollado distintas técnicas para el descubrimiento y desarrollo de fármacos; los fármacos originados a partir de plantas, siguen representando posiciones importantes dentro de la industria farmacéutica/médica.

A lo largo de la historia, se han desarrollado diversos fármacos innovadores y de gran relevancia a partir de los productos naturales extraídos de plantas. Un ejemplo de esto es la Aspirina®. El compuesto activo de este medicamento, es conocido como salicina, la cual fue aislada del sauce americano en 1828. En 1838

la salicina se hidrolizó y en 1859, se propuso la síntesis del ácido salicílico. En 1897 se sintetizó el ácido acetilsalicílico con un alto grado de pureza y libre de efectos secundarios. Dicho compuesto fue denominado Aspirina[®], la cual hasta la fecha sigue siendo un fármaco popular, utilizándose para el tratamiento del dolor, la fiebre y la inflamación (Mesa-Vanegas, 2017).

En Baja California (B.C.) diversas plantas son reconocidas por sus usos medicinales a manera de registros orales. La herbolaria en B.C. es un patrimonio cultural utilizado por diferentes etnias indígenas como los paipai, los kiliwa y los kumiai (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Sin embargo, su estudio actual es escaso y son muy pocos los registros escritos sobre el uso de las plantas medicinales de B.C.

López-Vázquez (2019), reporta especies medicinales nativas de B.C., como lo es la valeriana (*E. fasciculatum*), gordolobo (*G. purpureum*), hierba del paso (*H. vennetus*), jobjoba (*S. chinensis*), entre otras. Asimismo, Winkelman (1986) presentó veintidós plantas medicinales usadas frecuentemente en el norte de B.C. y sus usos.

Sin embargo, la mayoría de las plantas reportadas en este estudio no son nativas de B.C. Reportando al gordolobo para el tratamiento de problemas respiratorios (bronquitis, resfriados, asma, etc) y a la valeriana para el tratamiento de problemas nerviosos (estrés e insomnio).

López-Vázquez (2019) expone también la existencia de únicamente tres trabajos de investigación reportando el uso de plantas medicinales en B.C. Uno de ellos fue realizado por la UNAM en colaboración con el Instituto Nacional Indigenista cuya información fue concentrada en la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Los otros dos trabajos fueron realizados por Wilken, en 2012 con su tesis (An ethnobotany of Baja California's Kumeyaay indians) y en 2017, publicó un libro (Kumeyaay Ethnobotany: Shared Heritage of the Californias).

Aunque es importante mencionar que solo uno de estos trabajos: (Wilken, 2012); estudia específicamente las plantas nativas de B.C. y algunos de sus usos medicinales, pero su enfoque es más bien etnobotánico y no etnomédico. Entendiéndose por etnomedicina, las prácticas médicas tradicionales relacionadas con la interpretación cultural de la salud y la enfermedad y el abordaje del proceso

de atención médica y las prácticas curativas de un determinado grupo étnico (Mahapatra *et al.*, 2019) y como etnobotánica, el estudio de las interrelaciones que existen entre las plantas y los seres humanos, implica el estudio de la clasificación, el cultivo y el uso de plantas como alimento, medicina y refugio (Zimdahl, 2018).

Por otro lado, al hablar específicamente de los estudios realizados para la planta de interés: *Eriodictyon trichocalyx*, encontramos al trabajo presentado por Maher y colaboradores (2020), en donde enfocan su trabajo al estudio de las plantas pertenecientes al género *Eriodictyon* para el descubrimiento de nuevos tratamientos para la enfermedad de Alzheimer. Dentro de los géneros trabajados, manejaron la especie *E. trichocalyx* var. *lanatum* y var. *trichocalyx*.

Los resultados de la investigación mostraron que la decocción contiene flavonoides como eriodictiol, homoeriodictiol y esterubina, los cuales se caracterizan por presentar propiedades antibacterianas y antiinflamatorias (Montalvo *et al.*, 2017, Maher *et al.*, 2020). La esterubina, está presente en ambas variedades, e inclusive *E. trichocalyx*, fue una de las cuatro especies que mostraron mayor producción de esterubina y mayor protección en los ensayos de ferroptosis y oxitosis. También mencionan su capacidad antiinflamatoria, la cual se ve correlacionada con su producción de esterubina. Por otra parte, eriodictiol fue capaz de desplazar la unión de [(3)H]-resiniferatoxina e inhibir el influjo de calcio mediada por capsaicina, sugiriendo que eriodictiol actúa como un antagonista TRPV1 (Rossato *et al.*, 2011).

Además, el eriodictiol produce un efecto antinociceptivo en la prueba de la capsaicina en ratones, así como una reducción en la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica provocadas por la inyección del adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas (Rossato *et al.*, 2011). Lo anterior, resulta de gran importancia para la presente investigación.

Otro tema de interés para el presente trabajo, son las terapias ya existentes para combatir la AR y el uso de los PN para combatirla. Dichas terapias ya existentes a pesar de ser efectivas, producen efectos secundarios significativos. Existen reportes de componentes de PN con la capacidad de interactuar con los marcadores de la AR y tienen la capacidad de producir reducciones patológicas de la AR (**Tabla V**).

Tabla V. Descripción de los efectos y reducciones patológicas producidas por PN de plantas en pruebas experimentales de artritis.

Autor	Fitoquímico	Planta	Efectos en artritis
Lee et al., 2005	Ácido chebulágico	<i>Terminalia chebula</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Inhibió significativamente la proliferación de leucocitos •Suprimió la incidencia y severidad de la artritis •Previene signos y síntomas
Tekeoglu et al.,2007	Timoquinona	<i>Nigella sativa</i>	*Presentó efectos antiinflamatorios
Feng et al., 2007	Sinomenina	<i>Sinomenium acutum</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Reduce incidencia y severidad de la AE *Bloqueo de células inflamatorias, reduciendo la erosión del hueso y cartílago

Fuente: Elaboración propia con base en Gandhi y colaboradores (2021).

1.10. Justificación

La investigación biomédica está compuesta por diversas áreas dirigidas a la generación de nuevo conocimiento para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades que causan estragos y muchas veces, la muerte en humanos.

Las poblaciones de cada país son altamente beneficiadas por los resultados obtenidos de los estudios biomédicos, gracias al desarrollo de nuevos fármacos, vacunas o procesos para tratar o prevenir enfermedades. En México, la esperanza de vida ha aumentado en gran medida gracias a la innovación biomédica, así en 1930 las personas vivían en promedio 34 años, para 1970 este promedio aumentó

a 61 años y para 2019, la esperanza de vida ha llegado hasta los 75 años (INEGI, 2019).

Es importante recalcar que a pesar de que los sistemas de salud modernos se caracterizan primordialmente por el uso de moléculas sintetizadas. Los compuestos naturales derivados de plantas siguen encabezando posiciones importantes dentro de las terapias exitosas y modernas, por ej. morfina, quinina, vincristina, atropina, camptotecina, artemisina, etc. Inclusive, de acuerdo a la OMS el 11% de los fármacos enlistados como medicina esencial son derivados de plantas (Mesa-Venegas, 2017; Kagansky *et al.*, 2020).

Otro punto importante a mencionar es que a pesar del esfuerzo que han realizado diferentes grupos de investigación, así como las autoridades sanitarias del país, solo un pequeño grupo de plantas medicinales se han estudiado desde el punto de vista farmacológico, fitoquímico, toxicológico y farmacocinético (Alonso-Castro *et al.*, 2017). Kagansky y colaboradores (2020), reportan 400,000 especies vasculares restantes por estudiar a nivel mundial y añade que cada año, se descubren aproximadamente dos mil especies de plantas nuevas, lo que genera mayores probabilidades para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas.

En cuanto a las plantas nativas de Baja California y sus usos dentro de la herbolaria, sabemos que son y permanecen siendo un recurso valioso. Sobre todo para los habitantes de las zonas rurales quienes no gozan de un fácil acceso a las instituciones de salud pública y aunque estas plantas nativas son reconocidas por sus usos medicinales, los registros de sus estudios científicos son escasos.

En la revisión bibliográfica para esta investigación, se lograron recabar antecedentes de cuatro fuentes de investigación que incluían información general acerca de plantas de B.C., de los cuáles sólo uno de ellos estudia específicamente las plantas de B.C. (nativas y no nativas) y algunos de sus usos medicinales. Considerando lo anteriormente mencionado, esta investigación busca promover el estudio específico de las plantas nativas de B.C. para la identificación de nuevos productos naturales.

Por otro lado, al hablar de los fármacos sintéticos estos se elaboran por medio de diversas metodologías dentro del laboratorio y no son encontrados en la

naturaleza. Estos fármacos algunas veces pueden llegar a ser más potentes que los fármacos naturales, pero también hay reportes de sus efectos secundarios severos sobre el cuerpo humano.

Por ejemplo, el paracetamol es un fármaco antipirético reconocido a nivel mundial el cual tiene reportes de hepatotoxicidad como efecto secundario principal. Otro fármaco antipirético es el ibuprofeno, que como efecto adverso produce insuficiencia renal en niños, así como nefrotoxicidad (Nisar *et al.*, 2018).

La medicina herbal ha comenzado a utilizarse con mayor frecuencia en los sistemas de salud de las zonas urbanas de países desarrollados. Estas técnicas medicinales se consideran eficaces, seguras y con mayor accesibilidad hablando en términos económicos, lo anterior mientras el tratamiento sea guiado propiamente por un profesional médico. Esto para llevar un control en la calidad e interacción de productos herbales con otros medicamentos y una selección adecuada de proporciones, aumentando la seguridad del tratamiento (Iwanowicz-Palus *et al.*, 2019).

Por lo anterior, las investigaciones actuales enfocan sus estudios a los PN obtenidos de plantas con reportes dentro de la medicina herbal con la intención de conseguir fármacos con menor toxicidad, efectos adversos, evitar resistencia bacteriana y reducir costos.

En relación a la AR, esta enfermedad tiene una prevalencia a nivel mundial de cinco por cada mil adultos, afectando de 2 a 3 veces más a las mujeres que a los hombres. En México afecta entre el 0.3 y 1.6% de la población, siendo este porcentaje representativo de más de 1 millón de personas (Aletaha y Smolen, 2018). Si la AR no se trata correctamente el 80% de los pacientes tendrán articulaciones desalineadas y el 40% de ellos no podrán trabajar dentro de los 10 años posteriores al inicio de la enfermedad.

En nuestro país, la AR junto con otras enfermedades reumáticas son una de las principales demandas de consulta en el primer nivel de atención médica y representan un alto costo a los servicios de salud (Mould-Quevedo *et al.*, 2008). México hasta hoy en día no cuenta con un registro oficial de casos nuevos de AR, por lo cual la información sobre la incidencia, sigue siendo limitada. Quienes

padecen dicha enfermedad tienen un gasto de bolsillo muy elevado, Central ciudadano y consumidor (s.f.) reporta un gasto de bolsillo por paciente en pesos mexicanos de \$21,000 y un costo total asociado de atención de \$192,602 al año, en donde se consideran gastos por: hospitalización, incapacidad laboral, discapacidad, consulta privada, transporte, medicamentos, complicaciones cardíacas y pulmonares y cirugía ortopédica.

Este gasto de bolsillo, según INEGI y estimaciones del Central ciudadano y consumidor (s.f.) equivale a 5 veces el salario mínimo anual en la población. En los EE.UU en el año 2005, el costo anual de atención médica para la AR en dólares fue de \$8.4 mil millones, los costos asociados a consecuencias desencadenadas por la AR fue de \$10,9 mil millones, traduciéndose a un costo anual de \$19.3 mil millones. Al incluir los costos intangibles del deterioro de calidad de vida, mortalidad prematura y costos sociales anuales, resulta en un costo de \$39.2 mil millones de dólares anuales (Raimundo et al., 2019) y en el Reino Unido, en 1992 los costos directos de atención social y de salud para la AR se estimaron en más de £600 millones y los costos indirectos en £651 millones adicionales (Batko *et al.*, 2019).

Además de los altos costos reportados tanto en México, como en otros países desarrollados, las instituciones de salud en México (en específico el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), El Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y la Secretaría de Salud) tienen protocolos de tratamiento específico, que solo en algunos casos incluyen el uso de FARME, este resulta en un gran problema ya que estos son indispensables para el mejoramiento de las distintas afecciones en pacientes; del 100% de pacientes con AR solo un 5% logra tener acceso a este tipo de terapias. La carga económica de la AR vista desde un punto de vista social y económico tanto en países desarrollados como en desarrollo es alta.

Existen muchos factores importantes a trabajar, entre ellos: la etiología y patogénesis de la AR siguen sin ser completamente comprendidas, los tratamientos pueden fallar o producir respuestas parciales, faltan biomarcadores predictivos confiables de pronóstico, casi nunca se logra una remisión sostenida y es necesario una terapia farmacológica continua (McInnes y Schett, 2011). Por lo anterior, se

presenta una importante oportunidad para la búsqueda de tratamientos alternativos, con enfoque biomédico y con una posible reducción de los efectos secundarios producidos por las terapias ya existentes.

En relación a los estudios de investigación realizados para la planta de interés: *Eriodictyon trichocalyx*, identificamos que no existen suficientes referencias bibliográficas enfocadas a sus PN, ni a su uso. Hemos hallado tan solo dos investigaciones enfocadas a sus PN y en solo una de estas utilizaron los compuestos extraídos.

Bohm y Constant (1990), estudiaron los flavonoides obtenidos de las hojas de *E. trichocalyx* y su trabajo consistió en elucidar los componentes de su resina. La segunda investigación hallada fue la de Maher y colaboradores (2020), en donde enfocan su trabajo al estudio de las plantas pertenecientes al género *Eriodictyon*, incluyendo la especie *E. trichocalyx* var. *lanatum* y var. *trichocalyx* para el descubrimiento de nuevos tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.

Evidentemente, los estudios enfocados en el área de PN y biomedicina para esta especie son verdaderamente escasos, lo cual convierte a esta investigación necesaria para construir una línea base de conocimiento para identificar las posibles propiedades antiartríticas de *E. trichocalyx*, especie nativa de Baja California usada tradicionalmente para tratar el dolor de tipo reumático.

1.11. Objetivo general

Determinar la actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y antihiperalgésica de la decocción de las hojas de *E. trichocalyx*, utilizando el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC); para establecer su potencial antiartrítico.

1.11.1. Objetivos específicos

1. Recolectar e identificar la especie *E. trichocalyx* para la obtención del extracto acuoso por medio de la técnica de decocción.
2. Determinar la toxicidad aguda de la decocción de las hojas de *E. trichocalyx* mediante la determinación de la dosis letal media aguda (DL₅₀) en roedores de acuerdo con el método de Lorke.

3. Evaluar el potencial antinociceptivo de la decocción de las hojas de *E. trichocalyx* mediante la prueba de formalina.
4. Aislar y caracterizar químicamente los metabolitos secundarios de la decocción de las hojas de *E. trichocalyx*, mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales, espectrométricos y espectroscópicos convencionales.
5. Caracterizar químicamente los aceites esenciales de las hojas frescas y secas de *E. trichocalyx*, mediante cromatografía de gases acoplada a cromatografía de masas.
6. Evaluar el efecto antiinflamatorio, antihiperalgésico y antialodínico del extracto acuoso de las hojas de *E. trichocalyx* en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.

1.12. Hipótesis

El extracto acuoso obtenido a partir de la decocción de las hojas de *E. trichocalyx*, presentará propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas y antihiperalgésicas en el modelo experimental AIC.

Capítulo 2. Desarrollo experimental

2.1. Material vegetal

La planta completa *Eriodictyon trichocalyx* fue recolectada en el mes de abril de 2023 en el municipio de Ensenada, Baja California con coordenadas 31° 59' 37.179", -116° 41' 13.2822". La identificación de la planta fue efectuada en el Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México (UNAM). Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, UNAM. El proceso de desecación del material vegetal fresco, se llevó a cabo a temperatura ambiente.

2.2. Obtención del extracto acuoso

El extracto acuoso se preparó mediante la técnica de decocción a partir de las hojas secas y molidas; para ello se pesaron 10 g de planta, los cuales se colocaron en agua en ebullición (1 L) durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo, el preparado se filtró por gravedad para descartar el material vegetal y las muestras se congelaron. Finalmente la decocción se llevó a sequedad por liofilización. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario. A partir de 10 g de material vegetal seco y molido de *E. trichocalyx* (hojas) se obtuvo un total de 0.392 g de extracto acuoso (seco) con un porcentaje de rendimiento del 39.2 %.

2.3. Procedimientos generales

2.3.1. Análisis cromatográficos

Para el estudio cromatográfico de este proyecto se utilizaron tres métodos: cromatografía en columna abierta (CCA), cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP).

La CCA se llevó a cabo a utilizando columnas de vidrio de distintas capacidades, empleando Sephadex LH-20 (Pharmacia) como fase estacionaria. Como fase móvil se utilizaron mezclas de Acetona y MeOH y H₂O_{dd} y MeOH. Para la cromatografía de fase reversa fue utilizada la resina Diaion HP-20

(polímero de estireno-divinilbenzeno) como fase estacionaria. Como fase móvil se utilizaron mezclas de H₂O_{dd} y MeOH, y acetona.

Los análisis por CCD se realizaron en placas aluminio de distintas dimensiones. El recubrimiento de las placas era de una capa de 0.25 mm de espesor (60 F245 Merck) de gel de sílice. Para los sistemas de elución, se utilizaron mezclas de elución de MeOH/CHCl₃ (5:95), MeOH/CHCl₃ (2:98), y H₂O_{dd}/MeOH/2-Propanol/n-butanol (15:10:60:15).

Los análisis por CCDP se realizaron en placas de aluminio y/o vidrio de 20x20 cm, recubiertas con gel de sílice de 1 mm de grosor. (60 F254, malla de 3.5-7.0µm ASTM, Merck, NJ, EE.UU.). Para los sistemas de elución, se utilizó una mezcla de MeOH/CHCl₃ (2:98). Las muestras se aplicaron con un tubo capilar y las placas se colocaron dentro de la cámara cromatográfica cubierta con una tapa de cristal. La visualización de la elución de las placas se realizó con lámpara UV (λ de corta de 254 nm) y como agentes cromógenos se utilizó una solución de 4-anisaldehído, sulfato cérico amoniacal/H₂SO₄ y una solución modificada de aldehído anísico (4-anisaldehído) para la detección de azúcares (0.5 mL de 4-anisaldehído, 9 mL de etanol al 95 %, 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado y 0.1 mL de ácido acético; Ikan, 1991), con posterior calentamiento para el desarrollo del color (110°C aproximadamente).

El perfil cromatográfico por líquidos de ultra-alta-eficiencia (UHPLC, por sus siglas en inglés) del extracto acuoso se obtuvo usando una columna Acquity UPLC® BEH C8 column (1.7µm, 2.1×100 mm) con guarda columna. La temperatura se mantuvo en 40 °C. La fase móvil consistió de una mezcla de Acetonitrilo (A) y agua acidificada con ácido fórmico al 0.1 % (B). Se utilizó una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Los cromatogramas y los espectros de masas se analizaron en el software MassLynx, versión 4.1

2.3.2. Análisis por cromatografía de gases acoplado a cromatografía de masas

La cromatografía de gases (CG) se efectuó en un cromatógrafo de gases (Clarus 680, Perkin Elmer, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas (Clarus SQ 8C, Perkin Elmer, EUA). La columna capilar utilizada fue la HP-5MS (5 % fenil – 95 % polimetilsiloxano; 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm

de espesor de film, Agilent Tech). Para la volatilización de las muestras se empleó un gradiente de temperatura que inició en 40°C durante 3 minutos hasta 300°C, con una velocidad de calentamiento de 20°C/min. La temperatura del inyector fue de 300°C, mientras que la línea de transferencia se mantuvo en 250°C. Se empleó helio como gas acarreador, con flujo de 1 mL/min. Modo de ionización: impacto electrónico a 70 eV; escaneo de rango de masa: 33-600 m/z.

Los compuestos presentes en las muestras fueron identificados mediante dos procedimientos: 1. Por el cálculo de los índices de retención (ecuación de Van Den Dool) utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C₇-C₃₀), y 2. Por la comparación de los espectros de masas con los reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés).

2.3.3. Análisis espectroscópicos y espectrométricos.

La elucidación de las estructuras moleculares de los productos naturales activos se realizó mediante la aplicación de las técnicas espectroscópicas. Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400 FT-IR spectrophotometer (Waltham, MA, USA) rango 4000-40 cm⁻¹ y de 600-50 cm⁻¹, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) se registraron en los equipos Varian Modelo VNMRS 9.4 T (Palo Alto, CA, USA) a 400 MHz (1H) o 100 MHz (13C) y espectrometría de masas (Bruker Avance III HD spectrometer (Billerica, MA, USA a 500 MHz (1H) o 125 MHz (13C)). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales se utilizó el programa MestreNova® versión 12.

Los espectros de masas generados por la técnica de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo se registraron en un espectrómetro de masas SQD2 utilizando un barrido de 100 a 1000 unidades de masa-carga (m/z) por segundo.

Todos los análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM.

2.4. Estudio químico de la especie *E. trichocalyx*

2.4.1. Fraccionamiento del extracto acuoso de *E. trichocalyx*

El fraccionamiento del extracto acuoso de *E. trichocalyx* (2.5072 g) se llevó a cabo mediante CCA empacada con la resina Diaion HP-20 como fase estacionaria. El extracto se suspendió en H₂O_{dd}. Se utilizaron mezclas con metanol-agua desionizada en diferentes proporciones y acetona (**Tabla VI**). Este fraccionamiento permitió obtener 6 fracciones primarias.

Cada una de las fracciones fueron concentradas en un rotaevaporador, las seis fracciones fueron analizadas por CCD (**Figura 5**).

El análisis de CCD de las seis fracciones obtenidas del extracto acuoso de *E. trichocalyx* se realizó utilizando placas para CCF, eluyendo con dos diferentes mezclas de elución 1.- 10 ml de MeOH/CHCl₃ (5:95), 2.- 10 ml de H₂O_{dd}/MeOH/2-propanol/n-butanol (15:10:60:15).

Tabla VI. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta del extracto acuoso de *E. trichocalyx*.

Fracciones	Cantidad	Solvente	Concentración
1	0.5994	H ₂ O	100%
2	0.4082	H ₂ O:MeOH	75:25
3	0.3277	H ₂ O:MeOH	50:50
4	0.3829	H ₂ O:MeOH	25:75
5	0.1947	MeOH	100%
6	0.2232	Acetona	100%

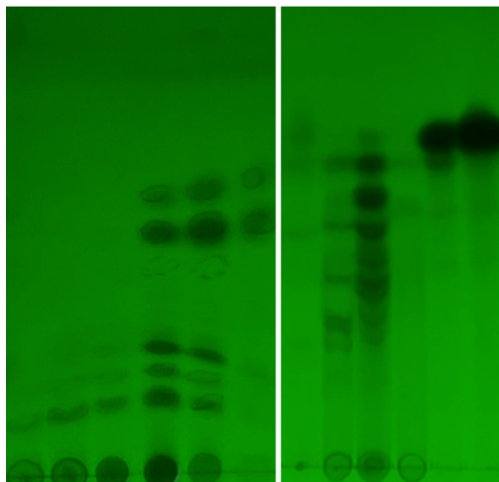


Figura 5. Cromatograma por CCF de los compuestos puros del extracto acuoso de *E. trichocalyx*. **A) Sistema de elución MeOH/CHCl₃ (5:95)** y **B) Sistema de elución H₂O_{dd}/MeOH/2-propanol/n-butanol (15:10:60:15)**. Visualización con lámpara UV UV ($\lambda = 254$ nm).

2.4.2. Fraccionamiento secundario de la Fracción primaria F5

La fracción F5 (0.2214 g) se sometió a un fraccionamiento secundario en cromatografía en columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria. Esta fracción se suspendió en H₂O_{dd}:MeOH 50:50. Para la fase móvil, se utilizaron distintas mezclas de los solventes H₂O_{dd} y MeOH (**Tabla VII**). Se recuperaron un total de 57 fracciones, las cuales fueron secadas en líneas de aire. Todas las fracciones obtenidas se analizaron por CCD (**Figura 6**). Las fracciones se reunieron por similitud en polaridad (**Tabla VIII**) y se seleccionaron las fracciones de interés (**Tabla IX**). De la fracción F-5-10 se detectó el (2R)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-[[{(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi} ácido propanoico (ácido romarínico) (1)). La fracción F-5-8 se sometió a un fraccionamiento terciario (Ver **sección 2.4.3**) con sephadex LH-20.

Tabla VII. Fases móviles utilizadas en el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5.

Fracciones	Solvente	Concentración
1-44	MeOH	100%
45-53	H ₂ O:MeOH	20:80
54-55	H ₂ O:MeOH	40:60
56-57	H ₂ O:MeOH	50:50

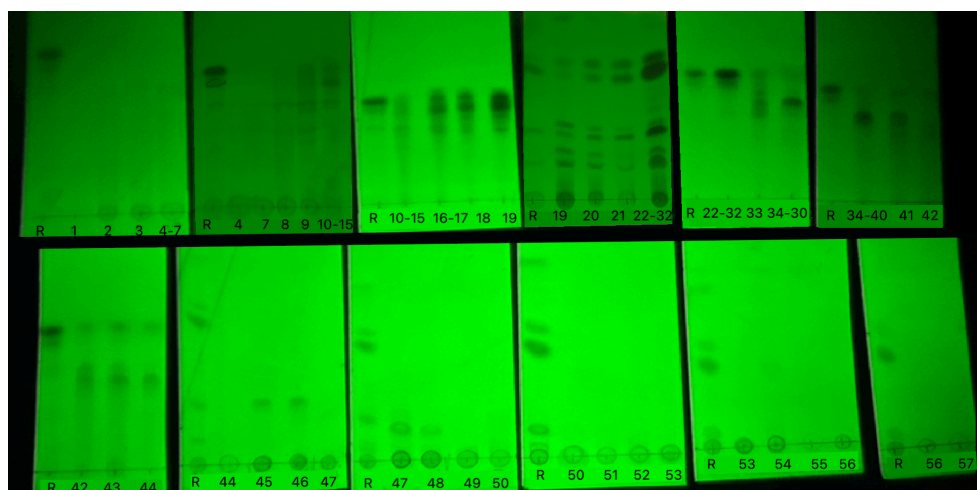


Figura 6. Cromatograma por CCF de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento secundario de F5.

Tabla VIII. Fracciones reunidas con clave asignada.

Fracciones reunidas	Clave
1	F5-1
2	F5-2
3	F5-3
4-7	F5-4
8	F5-5
9	F5-6
10-15	F5-7
16-32	F5-8
33	F5-9
34-40	F5-10
41	F5-11
42	F5-12
43	F5-13
44	F5-14
45	F5-15
46	F5-16

47	F5-17
48	F5-18
49	F5-19
50	F5-20
51	F5-21
52	F5-22
53	F5-23
54	F5-24
55	F5-25
56	F5-26
57	F5-27

Tabla IX. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5.

Fracciones	Cantidad (g)	Fase móvil
F5-8	0.1476	H ₂ O _{dd}
F5-10	0.0014	H ₂ O _{dd} :MeOH 20:80

2.4.3. Fraccionamiento terciario de la Fracción F5-8

La fracción secundaria F5-8 (0.1466 g) se sometió a un fraccionamiento terciario en columna abierta sobre Sephadex LH-20. Para la fase móvil, se utilizaron distintas mezclas de los solventes H₂O_{dd} y MeOH (**Tabla X**). Se recuperaron un total de 46 fracciones, las cuales se reunieron por similitud en polaridad (**Tabla XI**) y se seleccionaron las fracciones de interés (**Tabla XII**). El análisis de CCD de las fracciones obtenidas se realizó con una mezcla de elusión de MeOH:CHCl₃ (5:95) (**Figura 7**).

Tabla X. Disolventes utilizados para el análisis cromatográfico de la fracción F5-8 en columna de Sephadex LH-20.

Fracciones	Solvente	Concentración
1-41	MeOH	100%
42-45	H ₂ O _{dd} :MeOH	10:90
46	H ₂ O _{dd} :MeOH	20:80

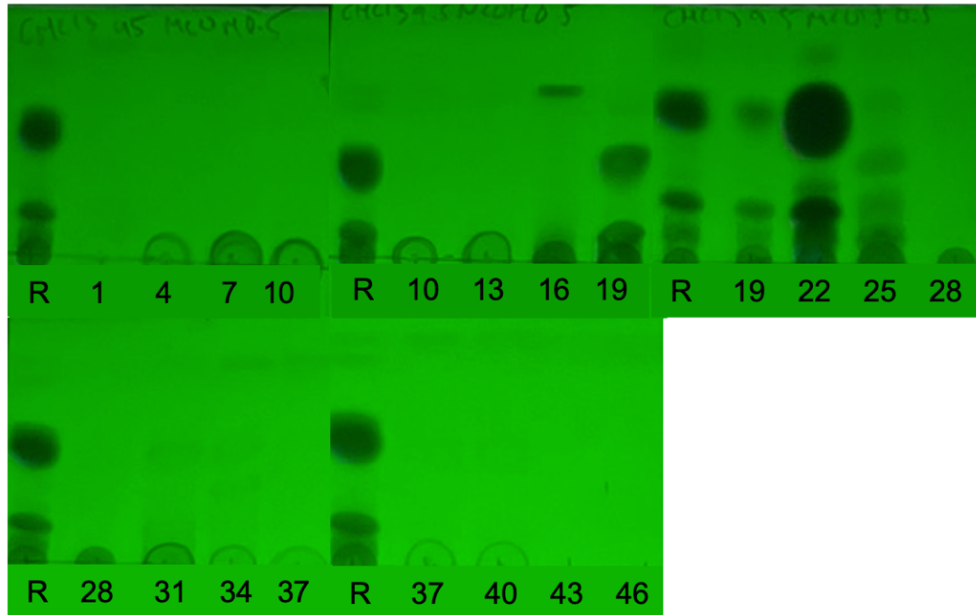


Figura 7. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento terciario de F5-8.

Tabla XI. Fracciones reunidas con clave asignada.

Fracciones reunidas	Clave
1	F5-8-1
2	F5-8-2
3	F5-8-3
4	F5-8-4
5	F5-8-5
6	F5-8-6
7	F5-8-7
8	F5-8-8
9	F5-8-9
10	F5-8-10
11	F5-8-11
12	F5-8-12
13	F5-8-13
14	F5-8-14
15	F5-8-15
16	F5-8-16
17	F5-8-17
18	F5-8-18
19	F5-8-19
20-22	F5-8-20
23	F5-8-21
24	F5-8-22
25	F5-8-23

26	F5-8-24
27	F5-8-25
28	F5-8-26
29	F5-8-27
30	F5-8-28
31	F5-8-29
32	F5-8-30
33	F5-8-31
34	F5-8-32
35	F5-8-33
36	F5-8-34
37	F5-8-35
38	F5-8-36
39	F5-8-37
40	F5-8-38
41	F5-8-39
42	F5-8-40
43	F5-8-41
44	F5-8-42
45	F5-8-43
46	F5-8-44

Tabla XII. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F5-8.

Fracciones	Cantidad (g)	Fase móvil
F5-8-20	0.0594	MeOH 100%

2.4.4. Fraccionamiento cuaternario de F5-8-20

La fracción F5-8-20 (derivada de fracción F5-8) se sometió a un fraccionamiento mediante CCDP. La fracción F5-8-20 (0.0594 g) se suspendió en CH₂Cl₂ y MeOH 1:1. Para la fase móvil, se colocaron 100 ml del sistema de solventes 2:98 H₂O_{dd}:CHCl₃ en la cámara de cromatografía (**Figura 8**). Una vez separados los compuestos, la placa se marcó con un lápiz alrededor de cada compuesto, para después rasparlos y recuperar la gel de sílice. Esta fase estacionaria después fue tratada con 20 ml de MeOH:CH₂Cl₂ 10:90, se filtró y los compuestos obtenidos (C1, C2 y C3) (**Figura 10**) fueron concentrados en rotaevaporador (Ver **Tabla XIII**) a los cuales se les aplicó el análisis cromatográfico en capa fina (**Figura 9**). El análisis de CCF se realizó utilizando placas cromatográficas, eluyendo con 10 ml de MeOH:CHCl₃ (2:98).

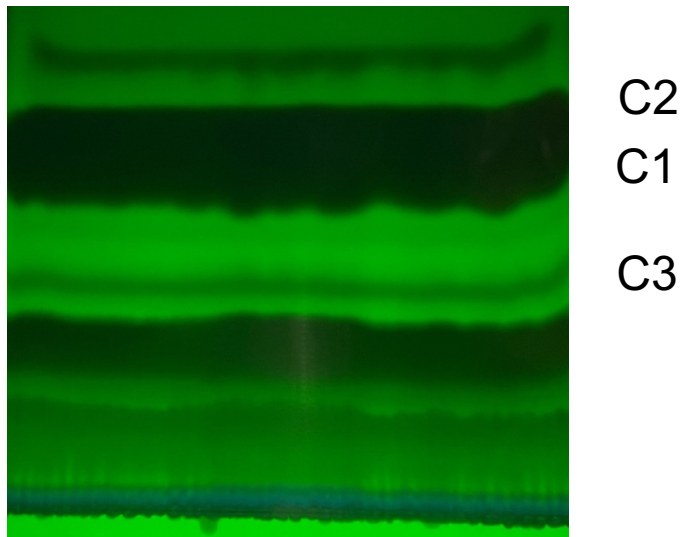


Figura 8. Cromatograma por CCDP de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F5-8-20.

Tabla XIII. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en CDP de la fracción F6.

Fracciones	Cantidad (g)
C1	0.0403
C2	0.0128
C3	0.0075



Figura 9. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F5-8-20.

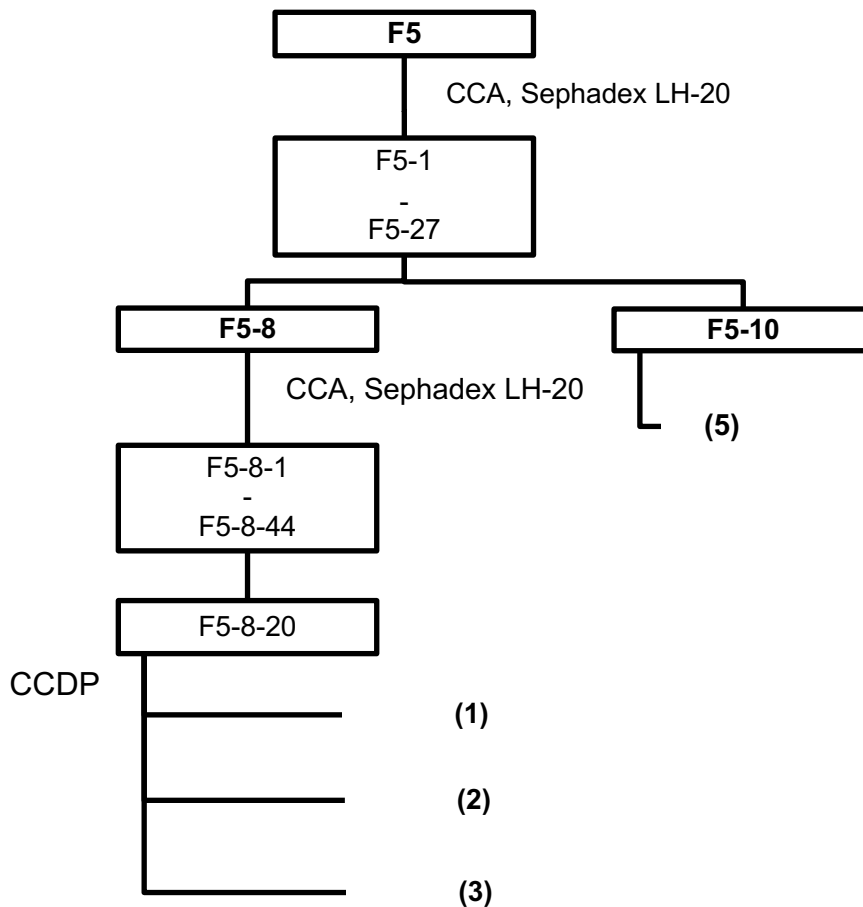


Figura 10. Aislamiento del ácido rosmarínico (5), 2,2-dimetil-3 hidroxicromano-6-ácido carboxílico éster metílico (1), 2-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (2) y Benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo) (3).

2.4.5. Fraccionamiento secundario de la Fracción F6

Las fracción 6 se sometió a un fraccionamiento mediante CCDP. La fracción 6 (0.0389 g) se suspendió en CH_2Cl_2 y MeOH 1:1. Para la fase móvil, se colocaron 100 ml del sistema de solventes 2:98 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}:\text{CHCl}_3$ en la cámara de cromatografía (**Figura 11**). Una vez separados los compuestos, la placa se marcó con un lápiz alrededor de cada compuesto, para después rasparlos y recuperar el sílice. El sílice después fue tratado con 20 ml de MeOH: CH_2Cl_2 10:90. El sílice después fue filtrado y los compuestos obtenidos (C1, C2 y C4) fueron concentrados en rotaevaporador (**Tabla XIV, Figura 14**) a los cuales se les aplicó el análisis cromatográfico en capa fina. El análisis de CCD se realizó utilizando placas cromatográficas, eluyendo con 10 ml de MeOH: CHCl_3 (2:98).

Tabla XIV. Fracciones de interés del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en CCDP de la fracción F6.

Fracciones	Cantidad (g)
C1	0.0062
C2	0.004
C4	0.0035

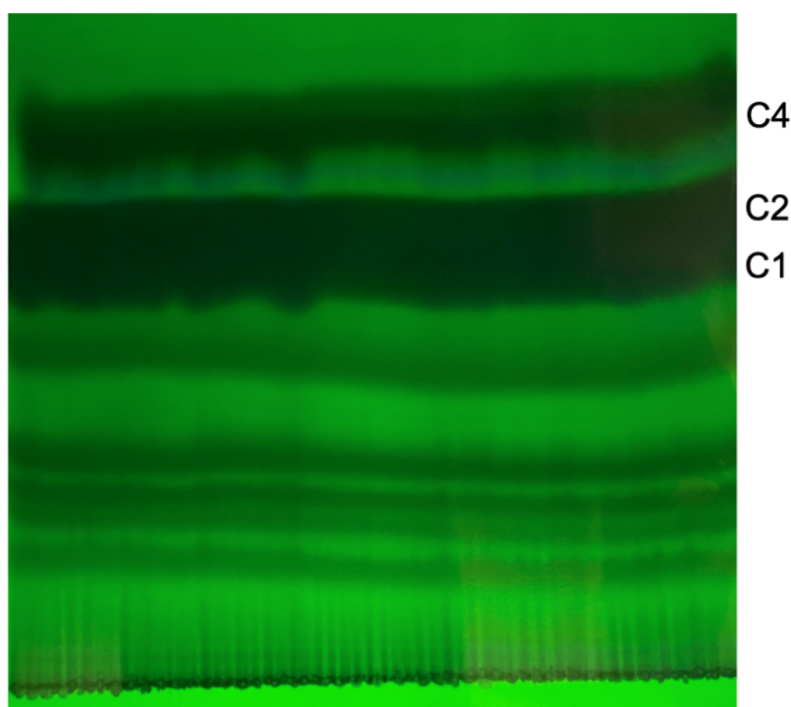


Figura 11. Cromatograma por CCDP del fraccionamiento secundario de la fracción 6.

2.4.6. Fraccionamiento secundario de la Fracción F6

Para el fraccionamiento secundario de la fracción F6 se utilizó una columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria. La fracción 6 (0.1658 g) se suspendió en MeOH 100%. Para la fase móvil, se utilizaron distintas mezclas de los solventes acetona y MeOH (**Tabla XV**). Se recuperaron un total de 56 fracciones primarias, las cuales fueron secadas en líneas de aire. El análisis de CCD de las fracciones obtenidas se realizaron utilizando placas para cromatografía, eluyendo con dos diferentes mezclas de elución 1.- 10 ml de MeOH:CHCl₃ (2:98) y 2.- 10 ml de (H₂O_{dd}:MeOH:2-propanol:n-butanol) (**Figura 12**). Según la similitud de desplazamientos de las bandas de los eluatos, se fueron agrupando las fracciones

con recorridos similares (**Tabla XVI**). La fracción F6-5 (**Tabla XVII**) se sometió a un fraccionamiento terciario (**Ver sección 2.4.6**).

Tabla XV. Fases móviles utilizadas en el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F6.

Fracciones	Fase móvil	Concentración
1-48	Acetona	100%
49-52	Acetona:MeoH	50:50
53-54	Acetona:MeoH	30:70
55-56	MeOH	0:100

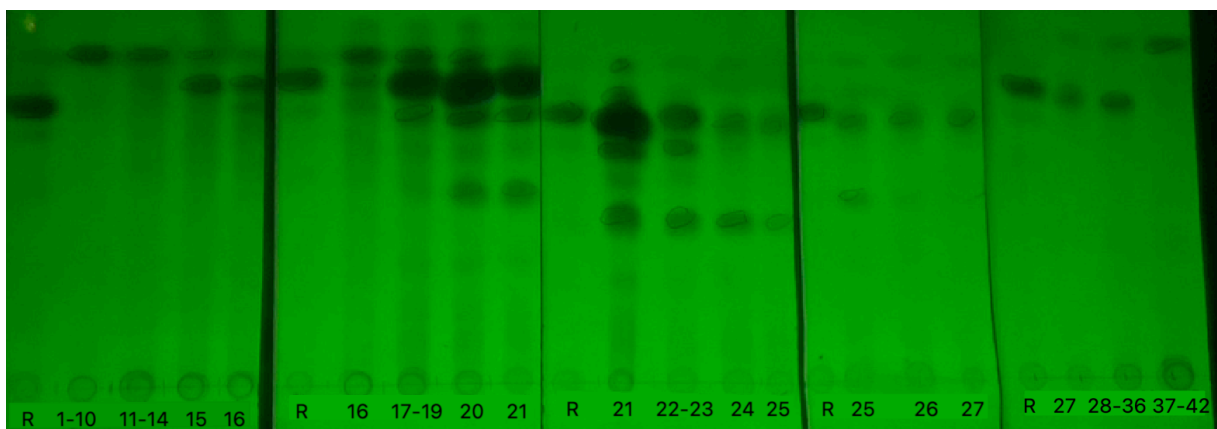


Figura 12. Cromatograma por CCD de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento secundario de F6.

Tabla XVI. Fracciones reunidas con clave asignada.

Fracciones reunidas	Clave
1-10	F6-1
11-14	F6-2
15	F6-3
16	F6-4
17-19	F6-5
20	F6-6
21	F6-7
22-23	F6-8
24	F6-9
25	F6-10
25	F6-11
27	F6-12
28-36	F6-13
37-42	F6-14

Tabla XVII. Fracciones de interés del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F6.

Fracciones	Cantidad (g)	Fase móvil
F6-5	0.0839	H ₂ O _{dd}

2.4.7. Fraccionamiento terciario de la Fracción secundaria F6-5

La fracción F6-5 (derivada de fracción F6) se sometieron a un fraccionamiento mediante CCDP. La fracción F6-5 (0.0594 g) se suspendió en CH₂Cl₂ y MeOH 1:1. Para la fase móvil, se colocaron 100 ml del sistema de solventes 2:98 H₂O_{dd}:CHCl₃ en la cámara de cromatografía (**Figura 13**). Una vez separados los compuestos, la placa se marcó con un lápiz alrededor de cada compuesto, para después rasparlos y recuperar la fase estacionaria y la muestra. El sílice después fue tratado con 20 mL de MeOH:CH₂Cl₂ 10:90. El sílice después fue filtrado y los compuestos obtenidos (C1 y C2) fueron concentrados en rotaevaporador (**Tabla XVIII, Figura 14**) a los cuales se les aplicó el análisis cromatográfico en capa fina. El análisis de CCD se realizó utilizando placas cromatográficas, eluyendo con 10 mL de MeOH:CHCl₃ (2:98).

Tabla XVIII. Fracciones obtenidas del fraccionamiento secundario de F6-5 mediante CCDP.

Fracciones	Cantidad (g)
C1	0.0096
C2	0.0041

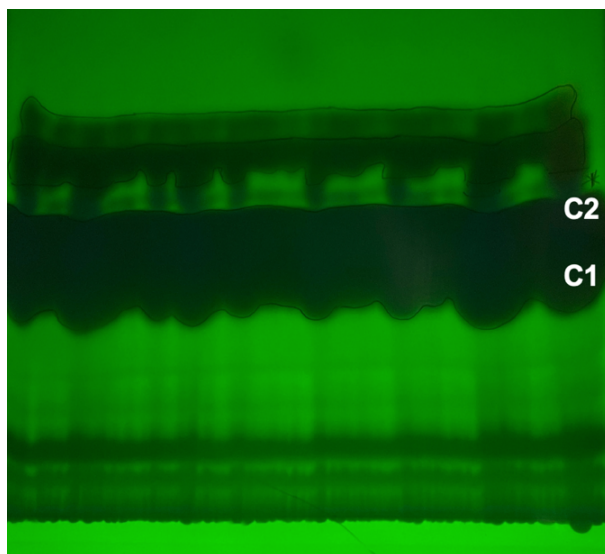


Figura 13. Cromatograma por CCDP de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento cuaternario de F6-5.

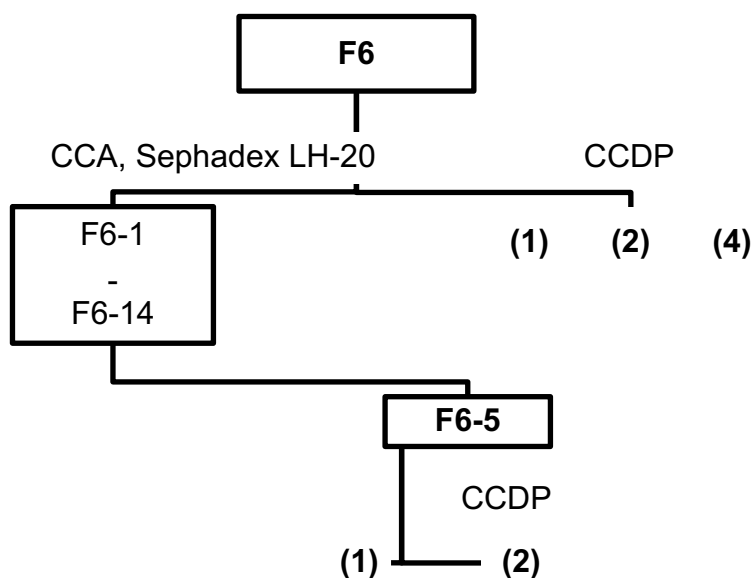


Figura 14. Aislamiento del 3-hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (1), 2-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (2), 3-acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (4) a partir de la fracción F6.

2.5. Preparación del aceite esencial (AE)

2.5.1. AE de hojas de *E. trichocalyx* frescas y secas

Todos los aceites esenciales (AE) se prepararon mediante la técnica de hidrodestilación. Para los aceites esenciales, tanto de planta fresca como seca, se utilizaron 100 g de material vegetal. y 1.5 L de agua destilada. El AE se extrajo por

un periodo de 2 h 30 min (tomando como referencia el tiempo 0 a partir de la primera gota que destiló). Todo esto se repitió por triplicado. Al término de la extracción, la esencia se separó del hidrosol mediante un proceso de partición con diclorometano (3 X 400 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío (ver peso en **Tabla XIX**). Dicho proceso se realizó por triplicado. El rendimiento para el AE de hojas frescas fue de 0.353% y el de hojas secas fue de 0.257%. Todas las esencias se almacenaron a -4°C hasta su análisis por CG-EM, utilizando las condiciones de análisis descritas en el inciso **2.3.2**.

Tabla XIX. Claves y pesos obtenidos de los AE obtenidos de hoja fresca y seca.

Clave	Cantidad (g)
Hoja fresca	
RMIAE	0.3715
Hoja seca	
RMAES1	0.2700

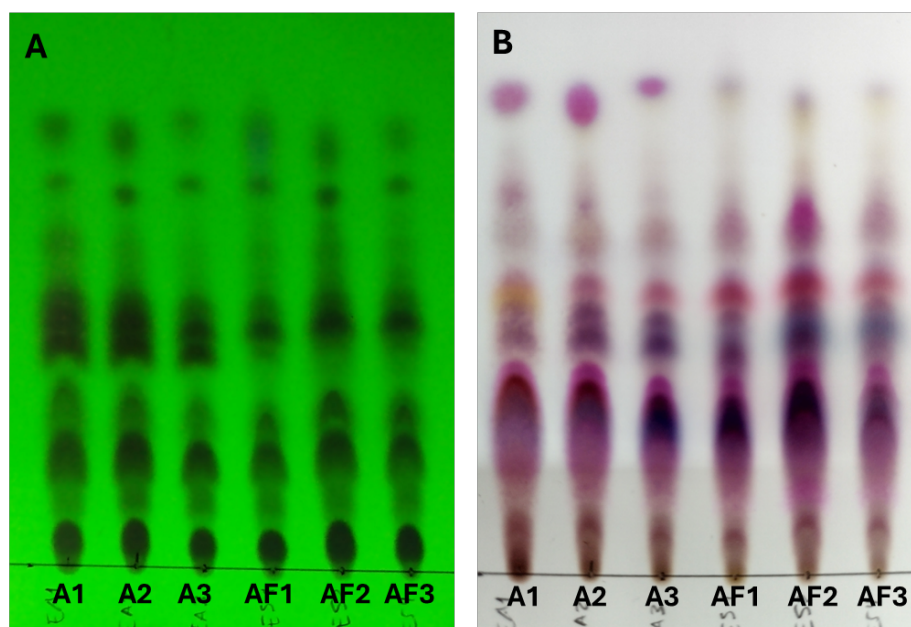


Figura 15. CCD de los aceites esenciales preparados con planta fresca (AF1–AF3) y seca (A1–A3) de *E. trichocalyx*. A: Visualización con lámpara de UV a 254 nm; B) revelada con el agente cromógeno de anisaldehído. Fase estacionaria: sílica gel 60 F25

2.6. Evaluaciones farmacológicas

2.6.1. Animales

Ratas hembra de la cepa Wistar, así como ratones hembra y macho ICR fueron obtenidas de Envigo México RMS (CDMX) y reproducidos en el bioterio de la Facultad de Medicina y Psicología, mismo sitio donde se alojaron a lo largo del proyecto de investigación. Al comienzo del experimento se trabajó con ratas de un peso inicial de 175 a 180 g y se conservaron dentro de este mismo peso a lo largo de la investigación. Se utilizaron ratones de un peso de 25 a 30 g para las pruebas de toxicidad aguda y potencial antinociceptivo.

Ambos ratas y ratones fueron mantenidos a temperatura controlada de $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento 5001 - Laboratory Rodent Diet (Labdiet) y agua purificada (Bonafont®) (ad libitum). Todos los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las recomendaciones de la "Guía de los Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). En adición, el protocolo experimental fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California (CICUAL-PMCCM01-23-1).

Se realizaron todos los esfuerzos por minimizar el número de animales usados, así como su sufrimiento. Cada animal fue usado una sola vez y al finalizar el experimento fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital.

2.6.2 Obtención del tamaño de la muestra

Se usaron 9 animales por grupo, los cuales fueron asignados al azar. El cálculo se determinó utilizando la fórmula reportada por Arifin y Zahiruddin, (2017):

Comparación de grupos: **ANOVA de una vía**

Para ANOVA de una vía, el error entre sujetos DF (es decir, el DF intra-sujeto) se calcula como:

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1),$$

Donde N = número total de sujetos, k = número de grupos (6), n = número de sujetos por grupo

Al reordenar la fórmula, n se da como:

$$n = DF / k + 1$$

El efecto de un fármaco es producto de la concentración del fármaco en el sitio de unión (blanco molecular); sin embargo, las respuestas específicas a las concentraciones del fármaco suelen ser no lineales y, teniendo en cuenta que el efecto del fármaco es una función de la dosis y el tiempo, existe un nivel significativo de complejidad. Para simplificar este concepto, las curvas dosis-respuesta se generan utilizando una escala logarítmica en el eje x para la dosis del fármaco y una escala lineal en el eje y para el efecto en un punto de tiempo específico (p. ej., equilibrio/estado estacionario o efecto máximo). El tiempo hasta el estado estacionario está influenciado por varios factores, incluida la tasa de disociación.

Debe tenerse en cuenta que la curva de respuesta al fármaco variará entre individuos para el mismo fármaco y dosis (p. ej., según el sexo, el peso, la raza y la edad), así como dentro de un mismo individuo (p. ej., nivel de hidratación, presión arterial y enfermedad autolimitada). Por lo tanto, una curva de respuesta al fármaco representa una respuesta media que se puede aplicar en general a una población. La curva dosis-respuesta proporciona información valiosa sobre las características del fármaco y permite comprender varios conceptos farmacodinámicos específicos: respuesta a la dosis, pendiente de la curva y efecto máximo; potencia y eficacia; dosis efectiva 50%, dosis letal 50%, ventana terapéutica e índice terapéutico; tolerancia; sensibilización; y activación y antagonismo (Currie, 2018). Utilizando dicha escala logarítmica se obtuvieron las siguientes dosis a utilizar:

Grupos experimentales

1. no inmunizadas (NI)
2. artritis + vehículo (tween 80 al 0.2% en s.s. (NaCl 0.9 %), p.o.)

3. artritis + extracto de *Eriodictyon trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.)
4. artritis + diclofenaco (10 mg/kg, p.o.)
5. artritis + prednisona (10 mg/kg, p.o.)

Con base en el rango aceptable del DF, los DF en las fórmulas se reemplazaron con los DF mínimo (Festing, 2006) y máximo (20) para obtener el número mínimo y máximo de animales por grupo:

1. Mínimo $n = 10 / k + 1$

2. Máximo $n = 20 / k + 1$

$$\text{Mínimo } n = 10 / 5 + 1 = \mathbf{1.66}$$

$$\text{Máximo } n = 20 / 5 + 1 = \mathbf{3.33}$$

En total, los números mínimo y máximo de animales requeridos son:

3. Mínimo $N = \text{Mínimo } n \times k$

4. Máximo $N = \text{Máximo } n \times k$

$$1.66 \times 5 = \mathbf{8.3}$$

$$3.33 \times 5 = \mathbf{16.66}$$

2.6.3. Fármacos

NaCl (grado ACS, $\geq 99.0\%$), colágeno II derivado de cartílago de pollo (Bioreagent), adyuvante completo de Freund, ácido acético glacial (ACS, 99.7%), diclofenaco sódico, prednisona ($\geq 98\%$) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO, USA), mientras que isoflurano (Sofloran®) fue obtenido de Laboratorios PISA. Todos los fármacos fueron preparados el día del experimento y se administraron por vía esofágica (p.o.) en un volumen de 0.2 ml/10 g de peso corporal de las ratas por medio de una cánula gástrica para animales de laboratorio o por vía subcutánea (s.c.) en un volumen de 0.1 ml/10 g de peso corporal de las ratas.

2.6.4. Reactivos

Sulfato cérico (99.99%), silica gel 60 (Malla 70–230) y placas de silica gel 60 F254 (Merck, USA).

2.6.5. Disolventes

Acetonitrilo y agua (grado LC-MS), ácido fórmico (grado HPLC (Waters, MA, USA)), y todos los disolventes hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol (grado ACS) que se utilizarán para el análisis cromatográfico y fitoquímico serán obtenidos de J.T. Baker.

2.6.6. Preparación de las muestras

Las muestras ensayadas (extractos, fracciones y/o compuestos puros) y los controles positivos se prepararon utilizando como vehículo solución salina isotónica NaCl (grado ACS, $\geq 99.0\%$) con 0.2% de Tween 80.

2.6.7. Determinación de la toxicidad aguda

La toxicidad aguda de la decocción de *E. trichocalyx* se determinó mediante el cálculo de la dosis letal media empleando el método de Lorke (1983) en ratones. Para ello los ratones se dividieron en 7 grupos de tres animales cada uno. El grupo control recibió el vehículo (NaCl 0.9%), p.o. Los grupos restantes fueron administrados con el extracto de *E. trichocalyx* en dos fases, en la primera fase los ratones fueron administrados con las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, p.o. En la segunda fase los animales fueron administrados con las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg, en ambas fases los animales fueron mantenidos en observación y su peso corporal se registró por 14 días consecutivos. Después de este periodo de tiempo, el efecto tóxico y el daño macroscópico inducido en pulmones, corazón, estómago, hígado e intestinos se evaluó mediante la disección de los tejidos. Al terminar las dos fases del estudio la DL_{50} se calculó como la media geométrica utilizando la siguiente fórmula (Lorke, 1983):

$$DL_{50} = \sqrt{(a)(b)}$$

Donde **a** es igual a la dosis más baja que induce muerte en al menos un ratón y **b** la dosis más alta en la que no se producen muertes.

2.6.8. Evaluación de las conductas nociceptivas

2.6.8.1. Prueba de la formalina

Antes del experimento, los ratones fueron colocados en cilindros individuales de Plexiglass (25 x 40 cm) durante 30 minutos, para permitir su habituación (**Figura 16**). Para inducir la nocicepción, los animales recibieron subcutáneamente 40 μ l de formalina al 1 % en la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha. El comportamiento nociceptivo se observó inmediatamente después de la administración de formalina. Se colocó un espejo detrás del cilindro para facilitar la observación. La conducta nociceptiva fue cuantificada como el tiempo invertido en lamer la extremidad inyectada durante periodos de 5 min hasta 30 min después de la inyección.

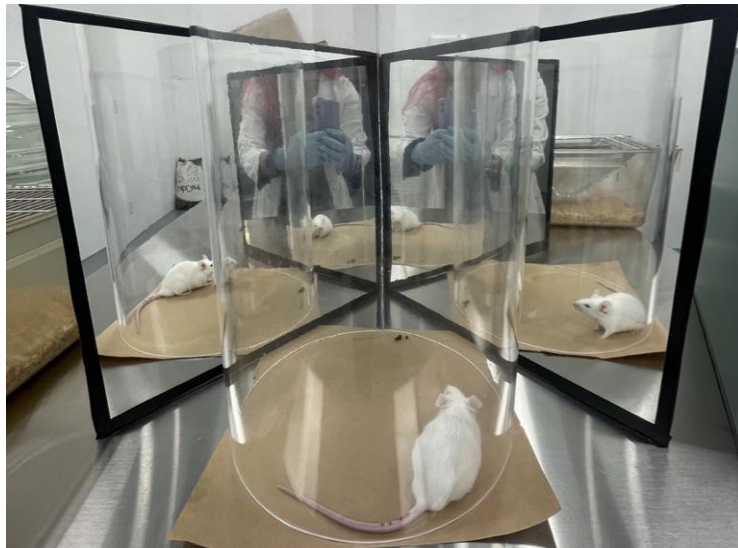


Figura 16. Ratón en cilindro Plexiglass. Fuente: Elaboración propia.

Las lamidas son fácilmente identificables y se caracterizan por una lamida o mordida de la extremidad inyectada (**Figura 17**). El tiempo invertido en lamer fue registrado en dos fases: Fase 1: 0-10 minutos inmediatamente después de la administración de formalina y Fase 2: 10-30 minutos después de la inyección de formalina.

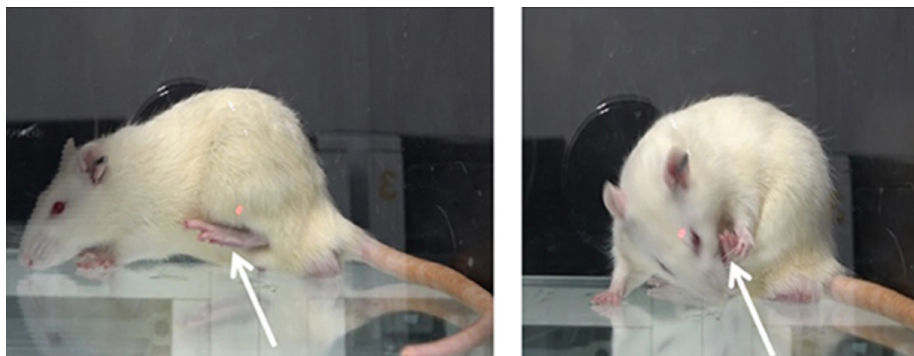


Figura 17. Prueba de formalina: Modelo de dolor inflamatorio agudo, en la que el animal presenta conductas relacionadas con dolor espontáneo. Dicho dolor es identificable a simple vista, y se observa a manera de: estremecimiento, levantamiento y lamida de la extremidad (Li *et al.*, 2018).

2.6.9. Modelo de artritis inducida por colágeno

El colágeno II derivado de pollo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) fue disuelto en ácido acético 0.1 M estéril a una concentración final de 1 mg/ml. Las ratas fueron inmunizadas con dos inyecciones intradérmicas de una emulsión de 1 mg/ml de colágeno II en el adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* H37 RA, 1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La emulsión fue preparada por la homogeneización de una parte de la solución de colágeno II y una parte del adyuvante completo de Freund a 4 °C. El día cero las ratas fueron inmunizadas con una inyección intradérmica de 200 µL de la emulsión a 10 cm de la base de la cola y el día 7 recibieron una segunda inyección de 200 µL de la emulsión. Antes de la inmunización las ratas fueron anestesiadas con isoflurano. Las artritis se desarrollaron aproximadamente 15 días después de la primera inmunización (Campo *et al.*, 2003).

2.6.9.1. Grupos experimentales

Se estudio el efecto anti-inflamatorio, antihiperalgésico y antiartrítico producido por la decocción de las hojas de *E. trichocalyx*. Para el estudio farmacológico los animales se dividieron en 6 grupos (8 animales por grupo): no inmunizadas (NI), artritis + vehículo (tween 80 al 0.2% en s.s. (NaCl 0.9 %), p.o.), artritis + decocción de *E. trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.), artritis + diclofenaco (10 mg/kg, p.o.) y artritis + prednisona (10 mg/kg, p.o.). Los fármacos fueron

administrados diariamente durante 5 días a la misma hora (10 a.m.) a partir del día 23 después de la primera inmunización con colágeno II. Para iniciar los diferentes tratamientos en el estudio sólo se incluyeron aquellos animales que alcanzaron un puntaje de artritis entre 8-12 al día 23 después de la primera inmunización con colágeno (**Figura 18**).

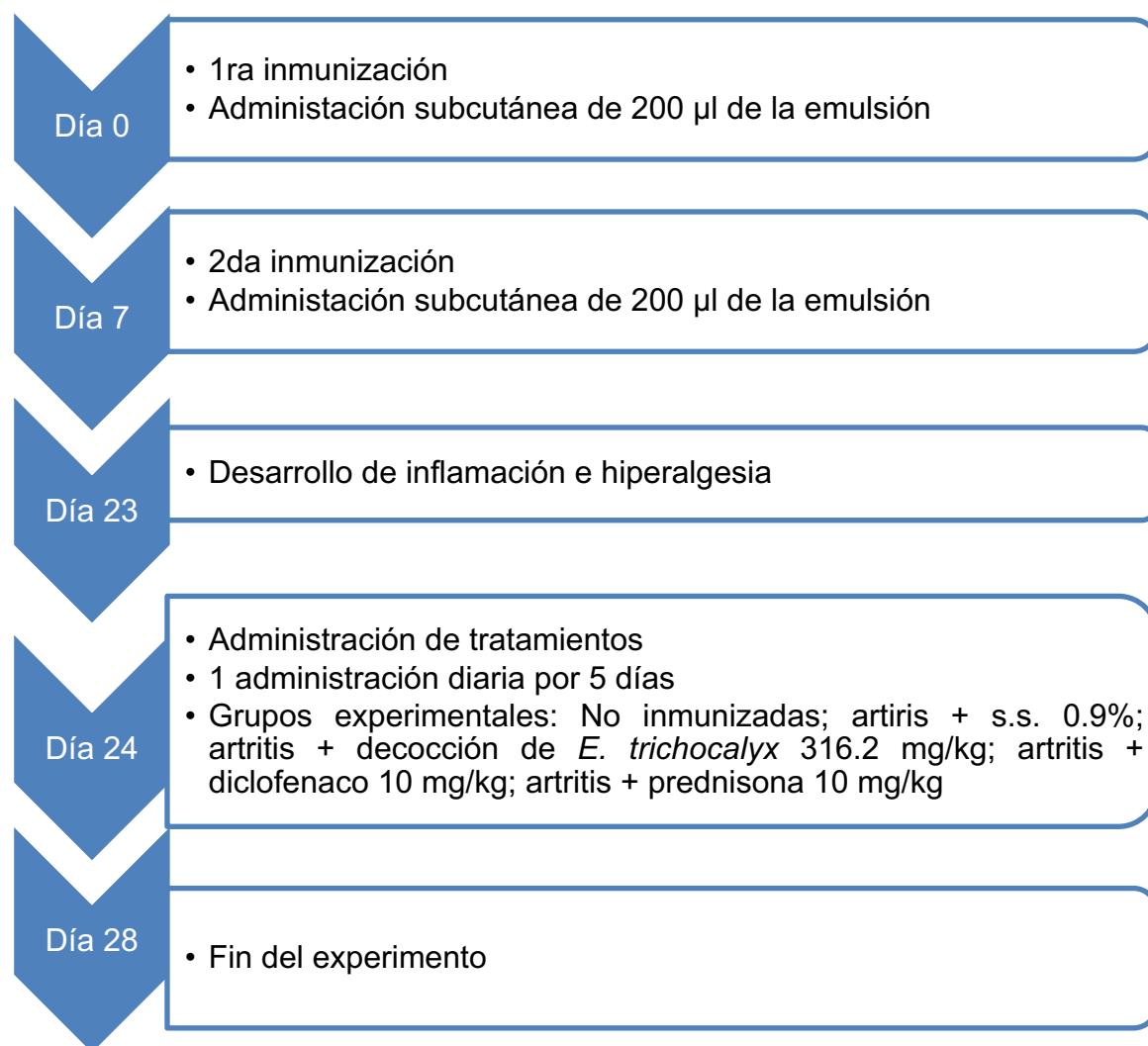


Figura 18. Diagrama de flujo del proceso de inmunización en los grupos experimentales.

2.6.9.2. Evaluación macroscópica del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno

Para evaluar la progresión de la artritis y la inflamación, las ratas fueron evaluadas en forma macroscópica utilizando una escala clínica de medida de 0 a 4,

donde 0 = sin presencia de signos de artritis, 1 = inflamación y/o enrojecimiento de un grupo de articulaciones (del tobillo o muñeca), 2 = presencia de inflamación y/o enrojecimiento en dos grupos articulaciones, 3 = presencia de inflamación y/o enrojecimiento en más de dos grupos de articulaciones y 4 = artritis severa en la extremidad completa (**Figura 19**).

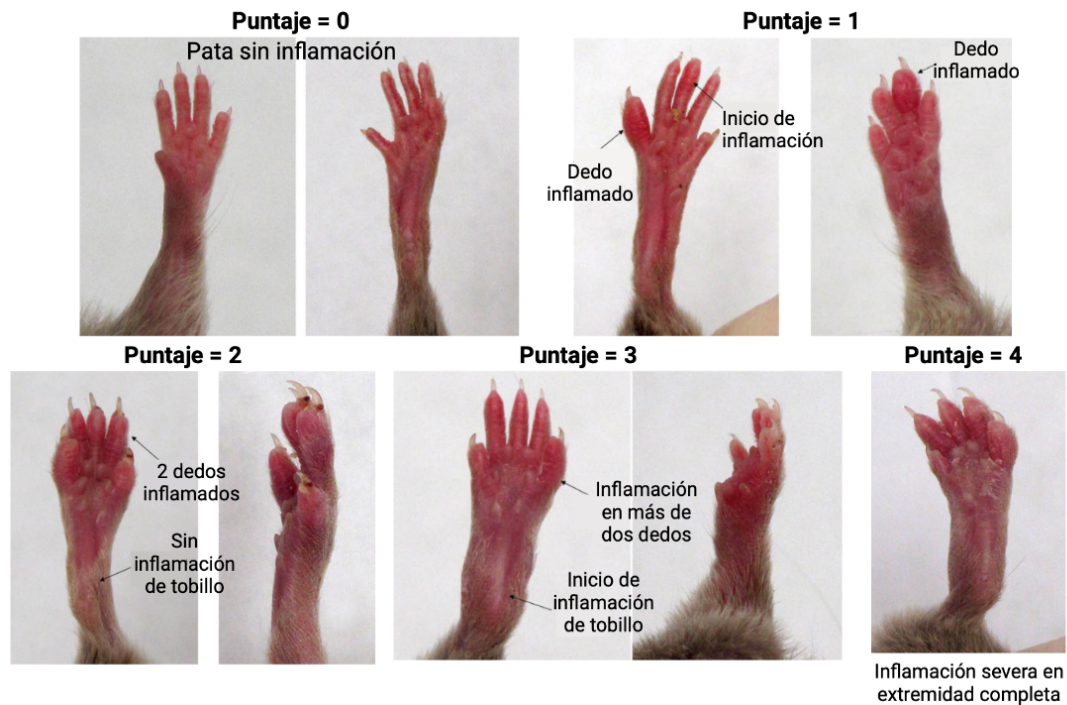


Figura 19. Puntajes de la evaluación macroscópica del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno. Imagen modificada de Hooke laboratories. Fuente: Elaboración propia.

El índice de artritis para cada rata fue calculado por adicionar los puntos de cada extremidad. La máxima puntuación posible para cada rata fue de 16 puntos (Campo et al., 2003). En adición, el grado de inflamación fue determinado por la cuantificación del cambio en el volumen desplazado por las extremidades posteriores, con ayuda de un pletismómetro (Panlab, Harvard Instruments, España). La evaluación del progreso de la artritis experimental y el grado de inflamación fueron cuantificados cada 3 días a partir de la primera inmunización y hasta el día 28 (**Figura 21**).

2.6.9.3. Medición de la hiperalgesia mecánica

La hiperalgesia mecánica fue evaluada en ambas tobillos usando el PAM (Pressure Application Measurement, Modelo 38500, Ugo Basile, Italia) (**Figura 18,C**). Una presión creciente (g) se aplicará en la parte lateral del tobillo, hasta que se produzca el retiro de la extremidad o la vocalización de la rata. Se uso un valor de corte de 500 g.

2.6.9.4. Medición del Umbral de Retiro Mecánico

El umbral de retiro mecánico (URM) fue medido usando el filamento electrónico de Von Frey (Modelo 38450, Ugo Basile, Italia) (**Figura 20, A-B**). Las ratas se colocaron en cámaras individuales sobre una plataforma perforada y se les permitió aclimatarse al entorno durante 30 min previos a las pruebas. Se aplicó una fuerza mecánica (g) a través del Filamento de Von Frey en la parte media de la superficie plantar de ambas extremidades posteriores de las ratas. El retiro rápido de la extremidad o la lamida provocada por la aplicación del estímulo mecánico se registró como el URM. La respuesta de cada rata se midió tres veces con intervalos de 5 min; la media de los tres valores de prueba se usó para el análisis estadístico.

2.7. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm EEM. En primer lugar, para evaluar la normalidad de los datos individuales, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y, en segundo lugar, empleamos la prueba de Levene para garantizar desviaciones estándar iguales entre los conjuntos de datos individuales. Dado que los datos individuales se distribuyeron normalmente y mostraron homogeneidad de varianzas entre los grupos, realizamos ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey para la comparación del efecto de una sola variable independiente y ANOVA de dos vías con la prueba pos hoc de Bonferroni para la comparación del efecto de dos variables independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la plataforma del software estadístico IBM® SPSS® Statistics. Para considerar diferencia

estadística significativa se estableció el valor de $p < 0,05$. Las gráficas se construyeron utilizando el software GraphPad Prism® versión 10.

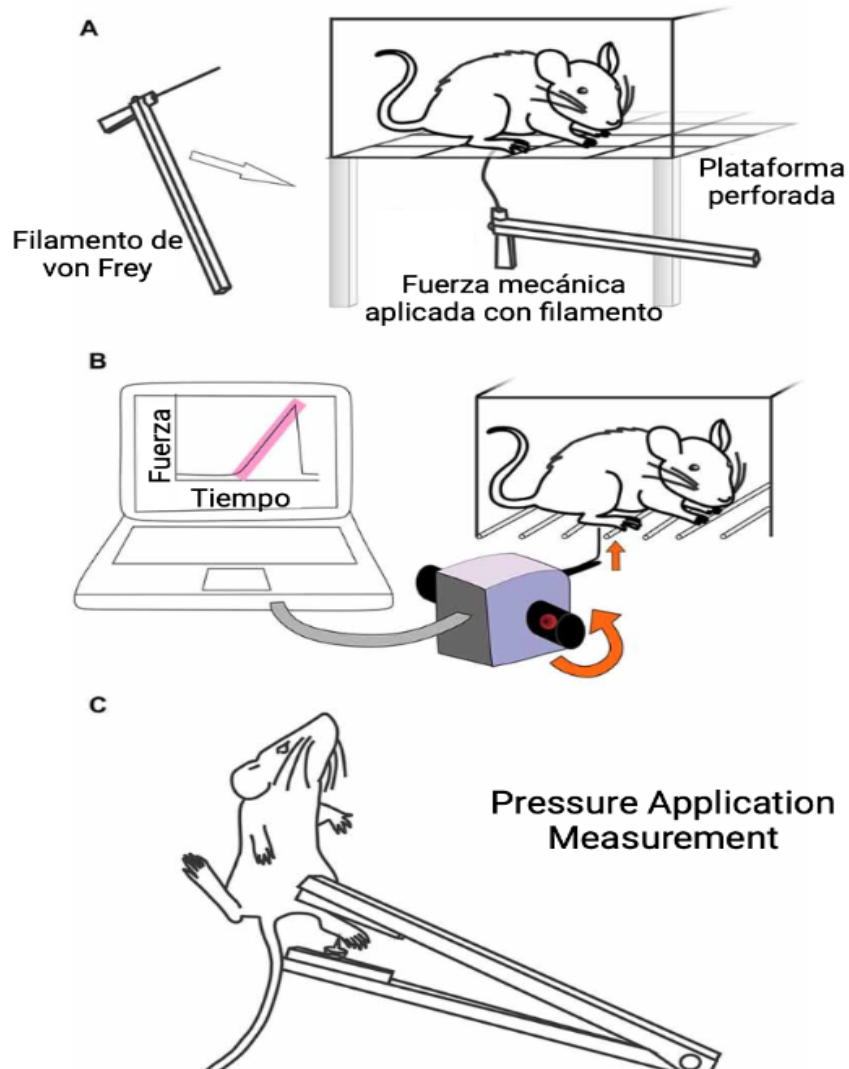


Figura 20. A) Fuerza mecánica aplicada con filamento de Von Frey. B) Medición del URM. C) Medición de la hiperalgesia mecánica con el método PAM. Imagen modificada de Deuis y colaboradores (2017).

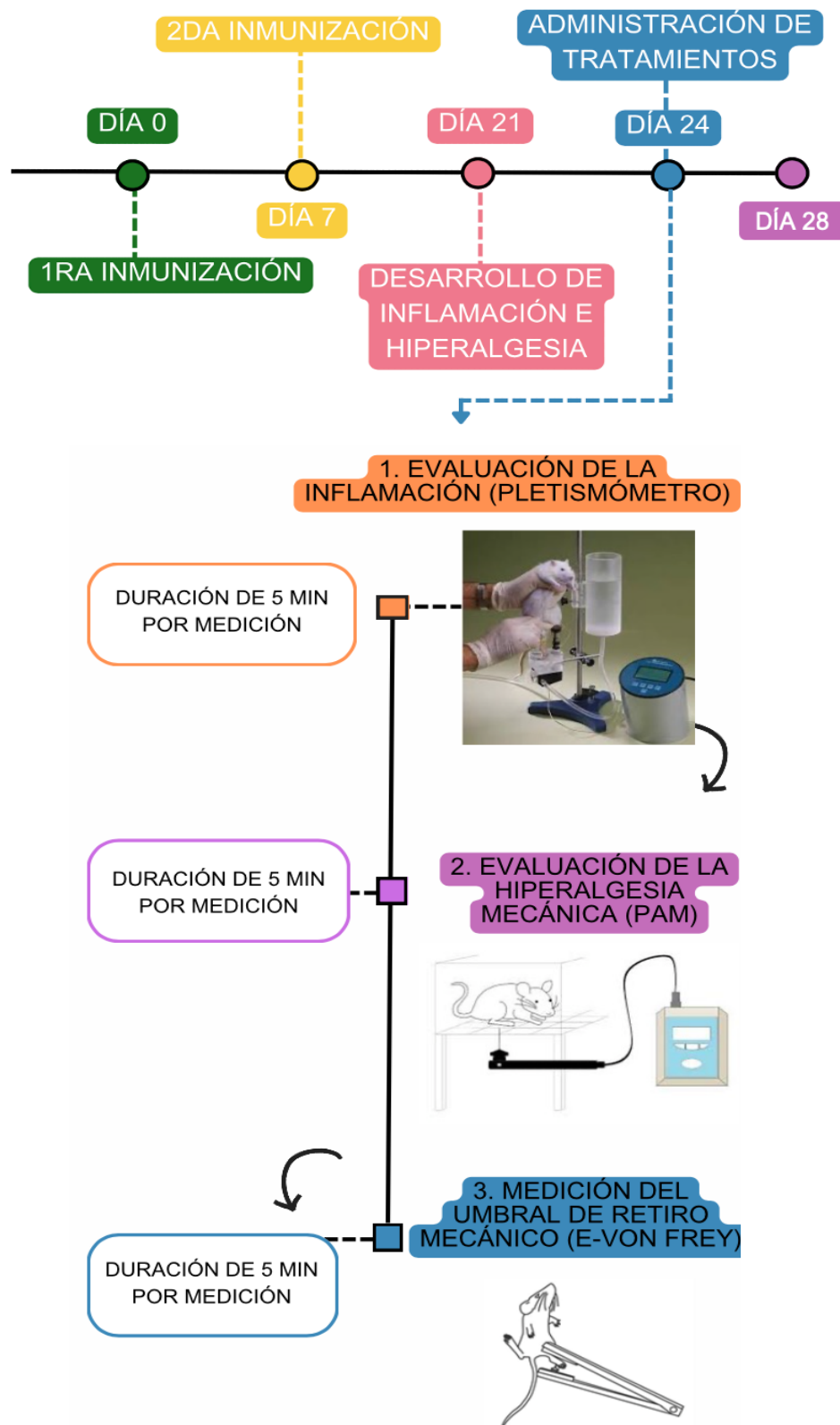


Figura 21. Diagrama de flujo de la evaluación del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno a partir de la administración de tratamientos.

Capítulo 3. Resultados y discusión

En el presente trabajo de investigación se estudió a la especie *Eriodictyon trichocalyx*, planta nativa de Baja California; utilizada en la medicina tradicional del pueblo indígena Kumiai para el tratamiento de la artritis reumatoide (Wilken, 2012). El estudio integral de la especie nos permite generar información científica enfocada a su inocuidad, propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas y antihiperalgésicas, así como también establecer la composición química y la determinación de algunos de los productos naturales del extracto acuoso, así como también de sus AE.

La investigación comenzó con la elaboración del extracto acuoso, seguido de la comprobación de la toxicidad aguda en roedores. Posteriormente se realizó la identificación de la composición química del extracto y de sus AE. Finalmente, se realizaron las pruebas en modelos de dolor, incluidos la prueba de la formalina, el modelo de artritis inducida por colágeno incluyendo la evaluación de inflamación con pletismómetro, evaluación macroscópica del progreso de la artritis y medición de: hiperalgnesia mecánica y umbral de retiro mecánico.

3.1. Evaluación de la toxicidad aguda inducida por la decocción de *E. trichocalyx*.

Para el análisis farmacológico de extractos vegetales y sus productos naturales, es necesario realizar estudios para la determinación de la toxicidad aguda. Dichos estudios son necesarios para determinar la inocuidad del extracto, identificar efectos adversos directos e indirectos y dosis letales y tóxicas. De manera general, factores como el peso corporal y el comportamiento del animal se utilizan para evaluar la aparición de efectos tóxicos (Enkhmaa *et al.*, 2023).

Los resultados de la evaluación de la toxicidad aguda inducida por la decocción de *E. trichocalyx* administrada vía oral (p.o.) a diferentes dosis se muestran en la **Tabla XX**. Durante los 14 días de observación no hubo muertes en ninguna de las dosis evaluadas en el ensayo de toxicidad aguda, por lo tanto, al calcular la DL₅₀ se infirió que la dosis letal media es superior a 5000 mg/kg. Adicionalmente, la toxicidad aguda fue monitoreada a través del registro de

conductas que indicarán signos y síntomas de intoxicación en los ratones (**Tabla XXI**). Durante el tiempo de evaluación los ratones fueron monitoreados y no presentaron conductas de toxicidad a ninguna de las dosis evaluadas. Después de este periodo de tiempo, el efecto tóxico y el daño macroscópico inducido en pulmones, corazón, estómago, hígado e intestinos se evaluó mediante la disección de los tejidos. La necropsia realizada indicó que el extracto acuoso de *E. trichocalyx* no afecta órganos vitales. Con los resultados obtenidos en la presente evaluación se deduce que los compuestos principales del extracto no son tóxicos y se logró identificar el rango de dosis óptimo para trabajar en los experimentos de pruebas biológicas.

Tabla XX. Dosis letal media de decocción de *E. trichocalyx* en diferentes concentraciones.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	DL ₅₀ (mg/kg)
<i>E. trichocalyx</i>	Fase I 10 – 1000	>5000
	Fase II 1600 - 5000	

Tabla XXI. Conductas monitoreadas durante la evaluación de la toxicidad aguda inducida por la decocción de *E. trichocalyx*.

Conducta	Dosis (mg/kg)						
	Control	10	100	1000	1600	2900	5000
Ataxia	X	X	X	X	X	X	X
Letargo	X	X	X	X	X	X	X
Apnea	X	X	X	X	X	X	X
Disnea	X	X	X	X	X	X	X
Salivación	X	X	X	X	X	X	X
Lagrimeo	X	X	X	X	X	X	X
Temblor	X	X	X	X	X	X	X
Somnolencia	X	X	X	X	X	X	X

Ruido nasal	X	X	X	X	X	X	X
Piloerección	X	X	X	X	X	X	X
Epistaxis	X	X	X	X	X	X	X
Convulsiones	X	X	X	X	X	X	X

3.2. Efecto antinociceptivo de la decocción de *E. trichocalyx* en la prueba de la formalina en ratones.

Distintas especies del género *Eriodictyon* han sido utilizadas a lo largo del tiempo para el tratamiento de problemas de inflamación y dolor (Maher et al., 2020). A pesar de esto, los estudios farmacológicos que respaldan estas actividades antinociceptivas y antiinflamatorias son escasos, sobre todo al hablar específicamente de *Eriodictyon trichocalyx*.

Para la caracterización del efecto antinociceptivo de la decocción de *E. trichocalyx*, se probaron diferentes dosis (31.6, 100 y 316.2 mg/kg, p.o.) y se comparó su efecto contra el grupo control negativo (s.s. 0.9%) y el grupo control positivo (diclofenaco 100 mg/kg).

La inyección subcutánea de formalina al 1% produjo el patrón típico de lamidas, el cual fue cuantificado para obtener el curso temporal de la conducta nociceptiva (**Figura 22**). Los resultados del curso temporal muestran un comportamiento bifásico; Fase 1: 0-10 minutos inmediatamente después de la administración de formalina y Fase 2: 10-30 minutos después de la inyección de formalina. Así mismo, se puede observar un aumento en la nocicepción a partir del minuto 5, para después comenzar a disminuir. Los resultados indican una disminución de la nocicepción a las 3 dosis administradas del extracto acuoso de *E. trichocalyx*.

Durante la fase I (dolor tipo agudo) la administración oral (31,6-316,2 mg/kg) del extracto acuoso de *E. trichocalyx* no afectó la nocicepción inducida por formalina (**Figura 23,A**). Durante la fase II (dolor de tipo inflamatorio) de la prueba de formalina, sólo la administración oral 316,2 mg/kg de extracto de *E. trichocalyx* produjo una reducción significativa del comportamiento de lamida ($p < 0,05$) (**Figura**

23,B). La administración oral de diclofenaco utilizado como control positivo redujo la nocicepción inducida por formalina sólo en la fase II.

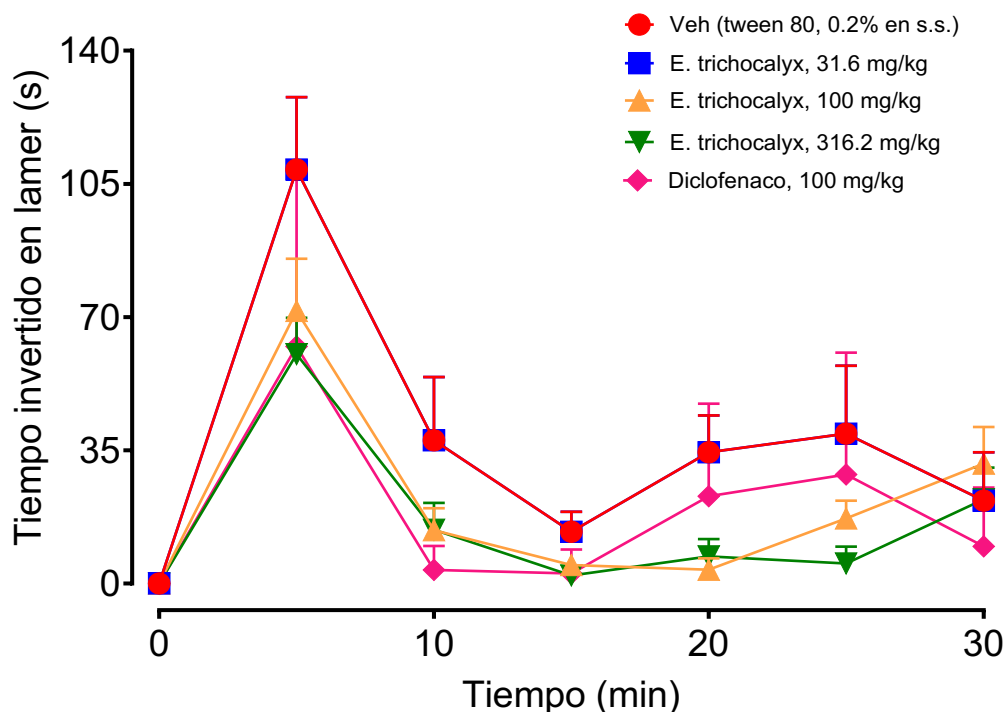


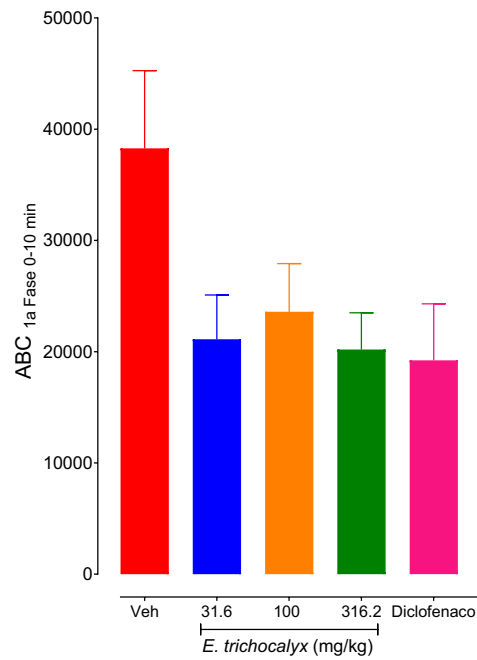
Figura 22. Curso temporal (0-30 min) del efecto antinociceptivo de *E. trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en comparación con el vehículo (s.s). Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6-8 animales.

Una vez obtenido el curso temporal se obtuvieron las áreas bajo la curva (ABC) para observar el efecto global de la evaluación farmacológica del extracto acuoso (**Tabla XXII**).

Tabla XXII. Porcentaje de antinocicepción obtenido a partir del ABC de las tres dosis administradas del extracto acuoso de *E. trichocalyx*.

Tratamientos	Dosis (mg/Kg)	ABC FASE I	ABC FASE II	% Antinociceptivo Fase I	% Antinociceptivo Fase II
Vehículo (s.s. 0.9%)	-	38272.88	35165.63	0.00	0.00
Extracto acuoso	31.6	21112.50	20306.25	44.8	42.3
	100	23587.50	14512.50	38.4	58.7
	316.2	20193.75	9787.50	47.2	72.2
Diclofenaco	100	19222.31	18294.56	49.8	48.0

A



B

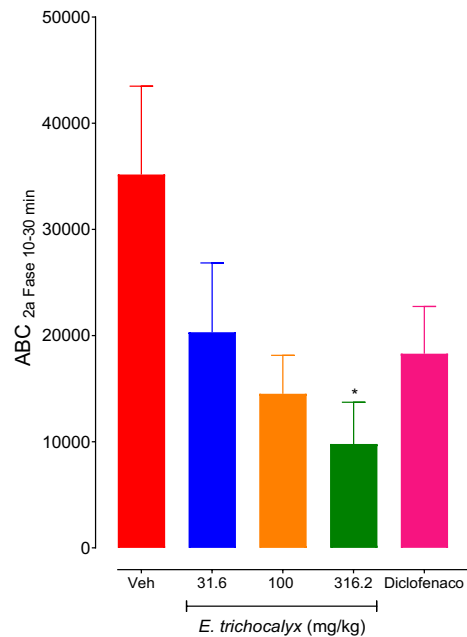


Figura 23. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de *E. trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) expresado como ABC. A) Fase I o neurogénica (0-10 min) y B) Fase II o fase inflamatoria (10-30 min) de la prueba de la formalina en ratones. Cada barra representa el promedio \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.0001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

Basándonos en las ABC obtenidas de acuerdo al tiempo de lamida en el modelo utilizado, procedimos a calcular el porcentaje de antinocicepción para cada dosis de las Fases I y II, de manera independiente.

En la **Figura 24** se puede observar cómo las 3 dosis utilizadas del extracto acuoso de *E. trichocalyx* presentaron efecto antinociceptivo mayor a 35% en la Fase I (dolor agudo), con un valor máximo de 47.2% para la dosis de 316 mg/kg; en lo que respecta a la fase II (**Figura 25**) correspondiente al tipo de dolor inflamatorio (fase de mayor interés), mostró efectos de mayor relevancia en comparación con la Fase I, siendo el efecto máximo correspondiente a la dosis de 316 mg/kg, alcanzando un valor del 72.17%.

Considerando el porcentaje de antinocicepción obtenido para el control positivo (47.98%) durante la Fase II, se puede decir que la dosis de 100 mg/kg sería la óptima para 1) Tener un efecto igual o mayor al fármaco utilizado y 2) Reducir la cantidad de extracto necesario para el efecto deseado.

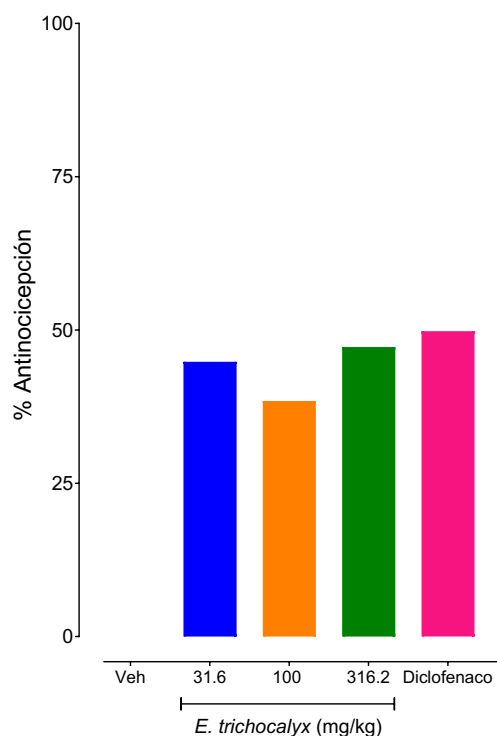


Figura 24. Porcentaje de efecto antinociceptivo producido por el extracto acuoso de *E. trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en la Fase I de la prueba de formalina en ratones. Las barras verticales representan el porcentaje de efecto antinociceptivo

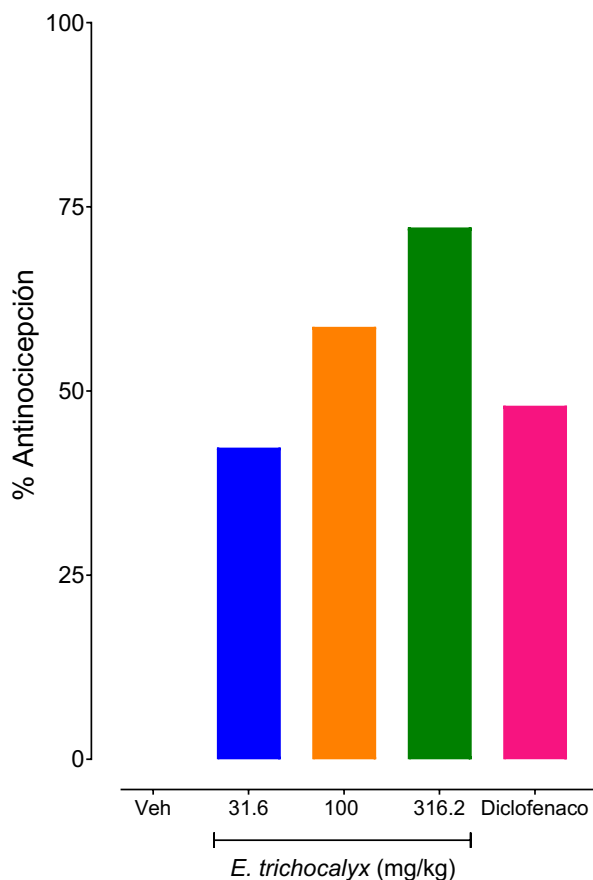


Figura 25. Porcentaje de efecto antinociceptivo producido por el extracto acuoso de *E. trichocalyx* (31.6-316.2 mg/kg, p.o.) en la Fase II de la prueba de formalina en ratones. Las barras verticales representan el porcentaje de efecto antinociceptivo.

Para el cálculo de la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀), se consideró únicamente la Fase II de la prueba de la formalina debido a una serie de factores: 1. La naturaleza del modelo empleado; 2. Los tratamientos que se administran como fármacos de referencia en estos ensayos tienen efectos limitados en la primera fase de la prueba; 3. Se obtuvo una diferencia significativa únicamente en la segunda fase. El método empleado para calcular la DE₅₀ del extracto acuoso de *E. trichocalyx* indica que se deben utilizar los datos de % de efecto en función del logaritmo de las dosis que se ajusten a una ecuación de una línea recta. Para este caso se emplearon los datos de todas las dosis utilizadas. Así pues, al evaluar las curvas dosis-efecto del extracto (**Figura 26**) se lograron estimar las DE₅₀, obteniendo un valor de 55.2 ± 14.7 mg/kg para el extracto de *E. trichocalyx*.

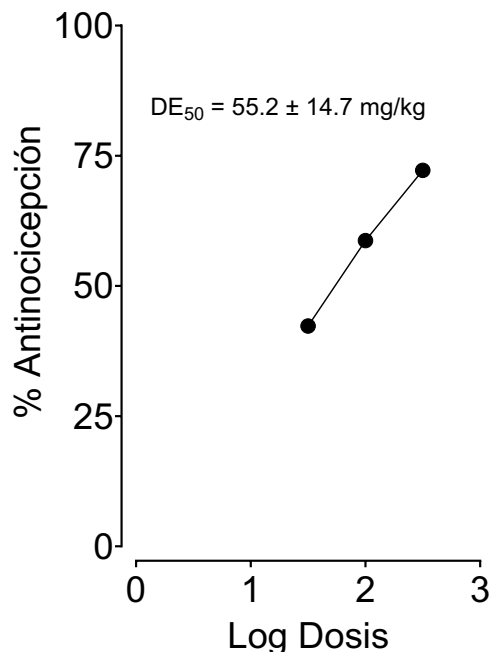


Figura 26. Curva dosis-respuesta del efecto de *E. trichocalyx* en la Fase II de la prueba de la formalina en ratones.

3.3. Evaluación del efecto antiartrítico de la decocción de *E. trichocalyx* en la inflamación en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas

3.3.1. Efecto de la decocción de *E. trichocalyx* sobre la inflamación en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.

Al comparar el grupo de ratas normales contra los otros cuatro grupos: vehículo (s.s.), diclofenaco 10 mg/kg, prednisona 10 mg/kg y *E. trichocalyx* (316.2 mg/kg), podemos observar un aumento significativo ($p < 0.0001$ en todos los casos) en el volumen de las extremidades posteriores indicando que la administración de colágeno II derivado de cartílago de pollo desencadena una respuesta inmune que conduce a la aparición de inflamación, modelando uno de los signos y síntomas presentes en la artritis reumatoide. Los resultados muestran que la administración de *E. trichocalyx* disminuye la inflamación de las extremidades posteriores. Por otra parte, la administración de prednisona 10 mg/kg fue el único grupo que presentó diferencia significativa contra el grupo tratado con el vehículo y *E. trichocalyx* 316.2 mg/kg ($p = 0.008$ y $p = 0.004$, respectivamente) (**Figura 27. A y B**).

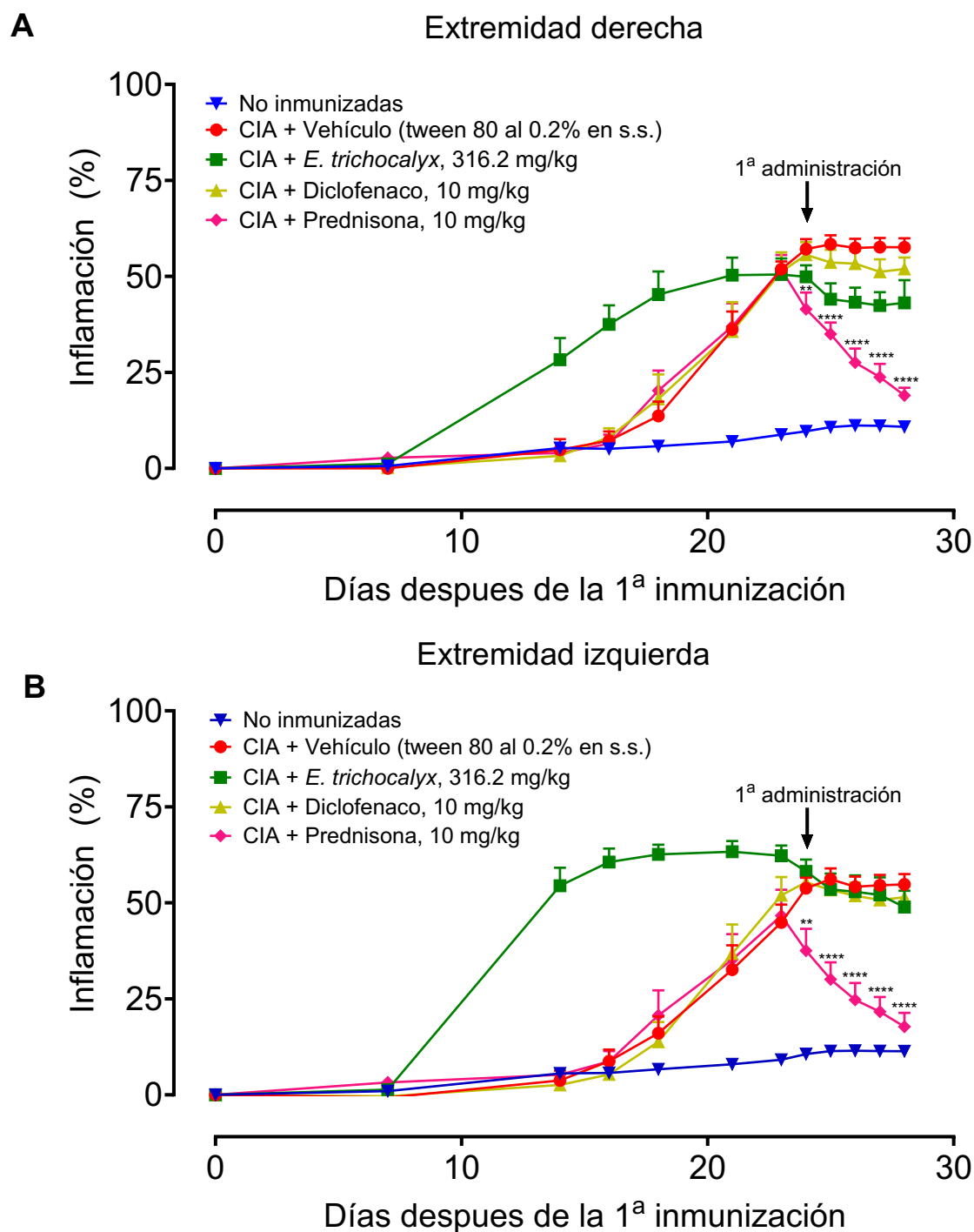


Figura 27. Efecto del extracto acuoso de *E. trichocalyx* (316.2 mg/kg, p.o.) sobre la inflamación de las extremidades posteriores en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas. A) Volumen de inflamación de la extremidad posterior derecha y B) Volumen de inflamación de la extremidad posterior izquierda. Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.01$, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Boferroni.

3.3.2. Efecto de la decocción de *E. trichocalyx* sobre la hiperalgesia mecánica en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.

Al comparar el grupo de ratas sanas contra los otros cuatro grupos: vehículo (s.s.), diclofenaco 10 mg/kg, prednisona 10 mg/kg y *E. trichocalyx* (316.2 mg/kg), podemos observar un aumento significativo ($p < 0.001$) en la hiperalgesia mecánica en ambas extremidades posteriores de todos los grupos (**Figura 28. A y B**), indicando que la administración de colágeno II derivado de cartílago de pollo desencadena una respuesta inmune que conduce a la aparición de hiperalgesia mecánica en la articulación del tobillo de las ratas, uno de los signos y síntomas presentes en la artritis reumatoide. Al hablar del efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *E. trichocalyx* y de los fármacos de referencia diclofenaco y prednisona en comparación con el grupo tratado con el vehículo, no se observaron cambios significativos.

3.3.3. Efecto de la decocción de *E. trichocalyx* sobre la alodinia mecánica en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas.

Al comparar el grupo de ratas normales contra los otros cuatro grupos: vehículo (s.s.), diclofenaco 10 mg/kg, prednisona 10 mg/kg y *E. trichocalyx* (316.2 mg/kg), podemos observar un aumento significativo ($p < 0.05$) en la alodinia mecánica en ambas extremidades posteriores en todos los grupos (**Figura 29. A y B**) indicando que la administración de colágeno II derivado de cartílago de pollo desencadena una respuesta inmune que conduce a la aparición de alodinia mecánica en las ratas, uno de los signos y síntomas presentes en la artritis reumatoide. Los resultados sobre el efecto antialodínico del extracto acuoso de *E. trichocalyx* y de los fármacos de referencia diclofenaco y prednisona en comparación con el grupo tratado con el vehículo no mostraron un efecto significativo.

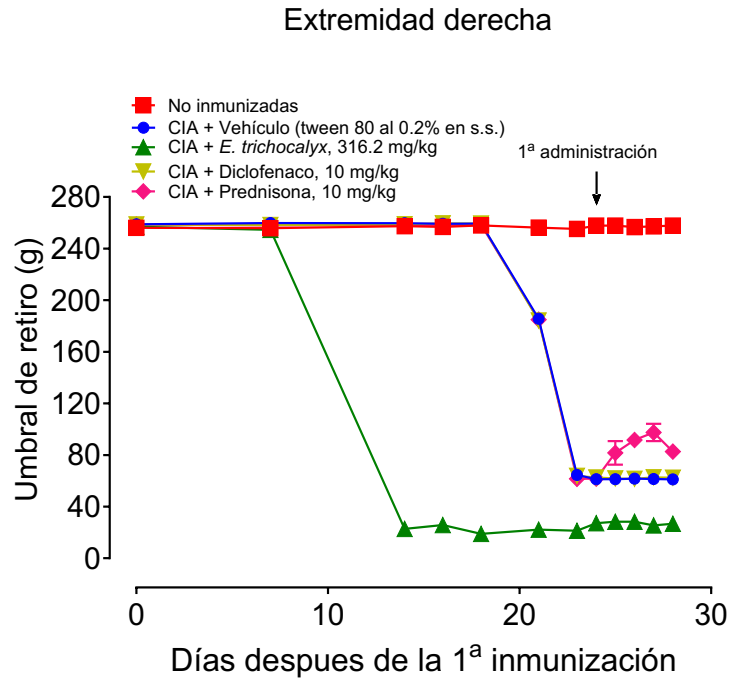
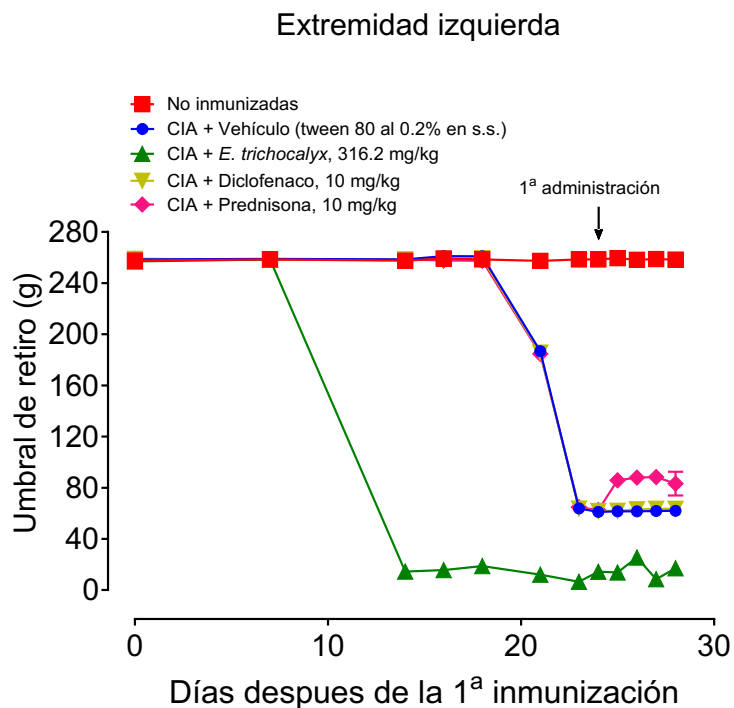
A**B**

Figura 28. Efecto del extracto de *E. trichocalyx* (316.2 mg/kg, p.o.) sobre la hiperalgesia mecánica en las extremidades posteriores en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratas. A) Umbral de retiro (g) de la extremidad posterior derecha y B) Umbral de retiro (g) de la extremidad posterior izquierda. Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. * $p < 0.05$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.

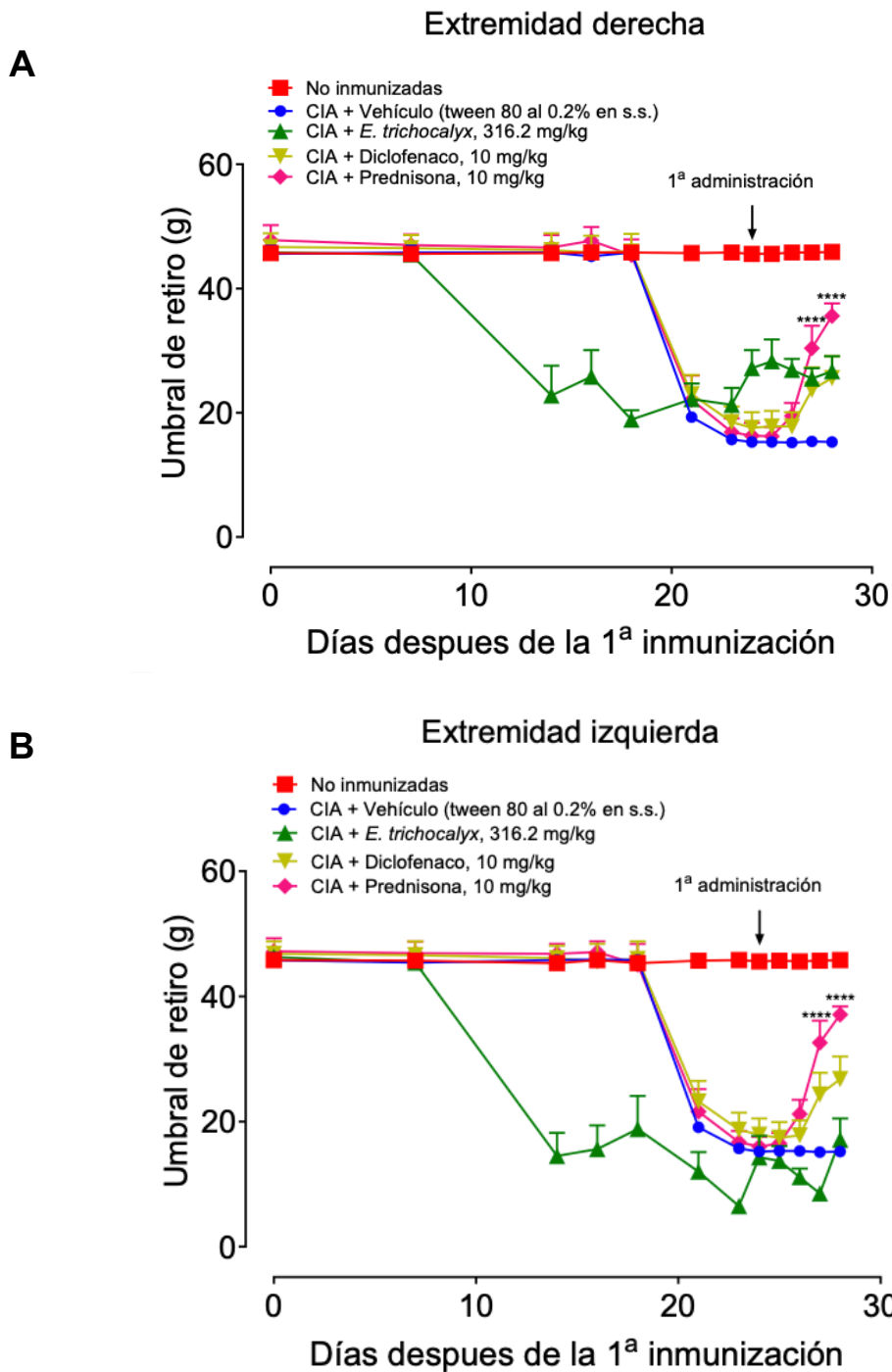


Figura 29. Efecto del extracto de *E. trichocalyx* sobre el umbral de retiro mecánico de las extremidades posteriores medido con el filamento electrónico de Von Frey. A) Umbral de retiro mecánico de la extremidad posterior derecha y B) Umbral de retiro mecánico de la extremidad posterior izquierda. Los datos son presentados como la media \pm EEM de 6-8 animales. **** $p \leq 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de la prueba Bonferroni.

En el presente trabajo se investigó por primera vez los efectos antinociceptivo, antihiperalgésico, antialodínico y antiinflamatorio de la especie *E. trichocalyx*. Al observar los resultados de nocicepción se identificó que el extracto produce un efecto significativo ($p=0.016$) sobre la Fase II de la prueba de la formalina (fase inflamatoria) y el compuesto mayoritario que fue identificado en el extracto acuoso fue el ácido rosmarínico (**5**). Este compuesto ha sido ampliamente estudiado y se han demostrado sus diversas actividades biológicas, entre ellas antiinflamatoria, antiapoptótica y antioxidante (Ghasemzadeh y Hosseizadeh, 2020). Prasanth y colaboradores (2022) estudiaron el efecto antinociceptivo del ácido rosmarínico (30 mg/kg) en la prueba de la formalina y observaron durante la fase I y II una reducción significativa del tiempo invertido en lamer la extremidad administrada con formalina ($p<0.01$), indicando que el ácido rosmarínico actúa de manera central y periférica en la atenuación del dolor, Lo anterior, podría explicar el efecto antinociceptivo del extracto acuoso observado durante la Fase II de la prueba de la formalina.

Al hablar de la eficacia antihiperalgésica y efecto antialodínico del ácido rosmarínico, Areti y colaboradores (2018) evaluaron la reducción de dolor de tipo neuropático, inducido por oxaliplatino; este fue administrado por un total de cuatro semanas. Las ratas que recibieron tratamiento de ácido rosmarínico (50 mg/kg) mostraron un aumento en el umbral de retiro de la extremidad posterior derecha ($p<0.01$). Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en las pruebas de hiperalgnesia y alodinia no mostraron diferencia significativa, pero es importante considerar el hecho de que las pruebas se realizaron utilizando el extracto acuoso y no el compuesto de manera individual. Este extracto contiene ácido rosmarínico pero este no representa la totalidad del extracto, si no una pequeña proporción del mismo; junto con otros compuestos como pigmentos, grasas, glucósidos, así como también los otros 4 compuestos aislados: 3-hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**1**), 2-(2-hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (**2**), benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo) (**3**) y 3-acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**4**).

En este trabajo se esperaban obtener resultados prometedores en la actividad biológica del extracto debido a que los metabolitos secundarios aislados previamente tienen reportes de efectos farmacológicos que interfieren en los procesos involucrados en la producción del dolor (Bohm y Constant, 1990, Maher et al., 2020; Manchope et al., 2022; Ntalouka y Tsirivakou, 2023; Rossato et al., 2011; Wang et al., 2023 y Wenji et al., 2023). No obstante, únicamente uno (ácido rosmarínico (**5**)) de los cinco metabolitos aislados concuerda con reportes anteriores (**Tabla III**). Los compuestos (**1 – 4**) son reportados por primera vez para esta especie

Al investigar la actividad biológica del compuesto **3**, observamos que esta ha sido enfocada únicamente a su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica (Jong y Chau, 1998; Lago et al., 2004 y Sahu et al., 2016); para los compuestos **1** y **2** hasta la fecha no se han realizado estudios acerca de su actividad biológica. Por lo anterior, no podríamos identificar su influencia sobre el efecto antinociceptivo.

Como se mencionó anteriormente, los estudios químicos de *E. trichocalyx* son escasos, además de que no existen reportes de su fitoquímica hablando específicamente del extracto acuoso de la planta. Es importante recordar, que la composición química de un extracto va a estar directamente relacionada con el tipo de metodología de extracción, incluyendo por lo tanto al solvente a utilizar. Los compuestos reportados para la especie que presentaban este interés farmacológico para los modelos de dolor en su mayoría eran flavonoides, y para la obtención de este tipo de compuestos lo ideal es trabajar con alcoholes como extractantes. Por lo cual resulta lógica esta discrepancia no solo en la fitoquímica de la especie, sino que también en los resultados de su actividad biológica. Sin embargo, es importante mencionar que el extracto utilizado tradicionalmente es acuoso, preparado mediante decocción.

3.4. Obtención e Identificación de los productos naturales del extracto acuoso de *E. trichocalyx*

El aislamiento, identificación y caracterización de los componentes químicos de los extractos de plantas, sienta las bases para la comprensión de la bioactividad de estos mismos. Por otra parte, debido a la complejidad de los extractos, es

necesario elegir el método de separación más adecuado de acuerdo al tipo de metabolitos presentes. El método de separación se elige de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del extracto, así como también de los compuestos que se buscan obtener (Zhang et al., 2023). En este caso particular, se realizó un extracto acuoso usando la técnica de decocción debido a que es la forma de preparación documentada en la medicina tradicional. Posteriormente se realizó un fraccionamiento del extracto acuoso utilizando como fase estacionaria la resina Diaion HP-20 y como fase móvil, mezclas de agua y metanol. Diaion HP-20 es una resina polimérica que consiste en una matriz de poliestireno-divinilbenceno, que se usa para cromatografía de fase reversa. Diaion HP-20 muestra una capacidad muy eficiente de separación de metabolitos presentes en extractos acuosos (decocciones, infusiones, percolados), además de que tiene buena desorción (su porcentaje de recuperación es mayor al 50 %) y fácil disolución de la muestra a separar (100 % soluble en agua) (Li y Chase, 2010; Palghadmal et al., 2022). La selección de la fase móvil (mezclas de agua-metanol) se realizó con base en la relación de hinchamiento del poro (adsorción-desorción); con agua se tiene un valor de 1.0 (más bajo de todos los disolventes) y con metanol 1.14. Se obtuvo una fracción final (consecutiva) con acetona, esto debido a que con este disolvente se tiene una relación de hinchamiento mucho mayor que el metanol (1.24) lo que permite aumentar la desorción de la muestra y recuperar la mayor cantidad de extracto. Esta separación permitió obtener 6 fracciones primarias (**Tabla XXIII**).

Tabla XXIII. Fracciones primarias obtenidas a partir de la columna Diaion HP-20.

	Porcentaje (%)	Disolvente empleado	Fracción obtenida
1	100	H ₂ O	F1
2	75:25	H ₂ O-MeOH	F2
3	50:50	H ₂ O-MeOH	F3
4	25:75	H ₂ O-MeOH	F4
5	100	MeOH	F5
6	100	Acetona	F6

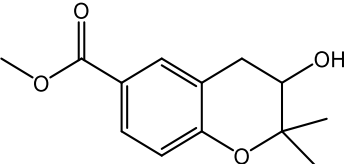
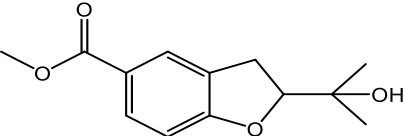
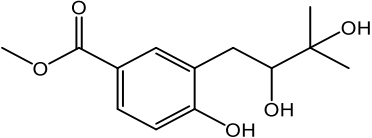
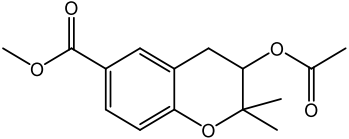
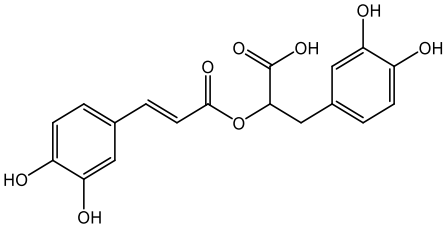
Posteriormente, y analizando los compuestos previamente reportados para *E. trichocalyx* (**Tabla III**), se realizó una separación de algunas fracciones primarias

obtenidas con la fase estacionaria sephadex LH-20. Esta fase estacionaria permite implementar una cromatografía por exclusión (Sen *et al.*, 2020). Se utilizó como fase móvil, mezclas de H₂O y MeOH.

A partir de estos procedimientos se logró aislar y purificar cinco productos naturales (**Tabla XXIV**). Los compuestos **1–4** fueron caracterizados espectroscópicamente y espectrométricamente utilizando sus datos de infrarrojo (IR) (Ver **Anexos 45, 50, 55 y 60**), de masas (EM) (**Figura 30 – 33**), y de resonancia magnética nuclear (RMN) (**Figura 34 – 35, Tabla XXV**). Los compuestos **1** y **2** fueron aislados como sólidos vitreos y los **3–5** como polvos blanquecinos. Los compuestos **1–4** son reportados por primera vez para la especie *E. trichocalyx*; siendo todos estos derivados del ácido benzoico prenilados. Arriaga-Giner (1988) reportó el aislamiento de los compuestos **1–3** a partir de *Eriodictyon sessilifolium*. En el caso del compuesto **4**, Arriaga-Giner lo obtuvo por medio de una reacción de acetilación. Por lo tanto, el compuesto **4** se reporta por primera vez en el presente trabajo como un producto natural.

Los compuestos **1–3** se aislaron de la fracción F5 y el compuesto **4** se aisló de la fracción F6. A partir de la fracción F5 se aisló un total de 1.8 mg de ácido rosmarínico puro (**5**) y de la fracción F3 se aislaron 300 mg impuros; siendo este el compuesto mayoritario (**Tabla XXIV**). Se obtuvieron también los perfiles cromatográficos del extracto acuoso por UHPLC fase reversa y RMN ¹H. Los resultados permiten confirmar al ácido rosmarínico (**5**) como uno de los principales compuestos, seguido de los derivados prenilados del ácido benzoico **1** y **2** (**Figura 36 y 37**). En el caso de los compuestos **1–4** sus datos espectroscópicos se compararon con los datos reportados por Arriaga-Giner (1988). En el caso del ácido rosmarínico (**5**) sus datos espectroscópicos (**Anexo 40 – 44**) fueron comparados con los datos de una muestra auténtica. El ácido rosmarínico es el único de los cinco compuestos aislados que fue reportado con anterioridad para la especie *E. trichocalyx* por Wang y colaboradores (2023) (**Tabla III**).

Tabla XXIV. Compuestos aislados del extracto acuoso de *Eriodictyon trichocalyx*.

Estructura	Cantidad (mg)
 <p>C₁₃H₁₆O₄ (pm = 236.26) 1 3-Hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo</p>	46.9
 <p>C₁₃H₁₆O₄ (pm = 236.26) 2 2-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo</p>	16.9
 <p>C₁₃H₁₈O₅ (pm = 254.28) 3 Benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo)</p>	7.5
 <p>C₁₅H₁₈O₅ (pm = 278.30) 4 3-Acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo</p>	3.5
 <p>5 Ácido rosmarínico</p>	1.8

3.5. Elucidación estructural de los compuestos 1— 4

Primeramente se describirán los datos que corresponden a los espectros de infrarrojo (IR) y espectros de masas (EM) y se terminarán discutiendo los datos obtenidos de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN).

Por lo que respecta a los espectros de IR, los compuestos 1—4 presentaron bandas de absorción entre 1717 y 1695 cm^{-1} , asignables a grupos carbonilo. También, presentan bandas de absorción entre 1434 y 1439 cm^{-1} , asignables a los anillos aromáticos. De manera destacable, el espectro de IR del compuesto 4 no presenta bandas características a grupos hidroxilo, que en el caso de los compuestos 1—3, se presentan como bandas anchas e intensas en el rango de 3387 a 3345 cm^{-1} . Al carecer el compuesto 4 de esta banda, se confirma que no presenta este grupo funcional en su estructura. (Ver **Anexo 60**).

En el caso de los espectros de masas, estos se obtuvieron por la técnica de impacto electrónico. En los cuatro espectros se pudieron detectar los iones moleculares y de esta manera conocer la masa molecular de los compuestos 1—4, para así proponer la fórmula mínima. Para el compuesto 1 y 2 se detectó el ión molecular de m/z 236 uma, mientras que para los compuestos 3 y 4 se detectaron los iones moleculares de m/z 254 y 278 uma, respectivamente. Esto permitió proponer las fórmulas mínimas de $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$ para 1 y 2, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$ para 3 y $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$ para 4.

Por lo que respecta a los espectros de RMN ^1H , ^{13}C , y bidimensionales (**Anexo 46 – 49, 51 – 54, 56 – 59 y 61 – 64**) y de acuerdo con la regla establecida por Ren y colaboradores (2020) se logró diferenciar a los núcleos correspondientes a grupo pirano, furano y la cadena de isopreno unidos al anillo aromático. Esta regla establece que los desplazamientos de los carbonos C-2' y C-3' de la cadena de isopreno muestran diferencias significativas, de aproximadamente 10 ppm. Debido a los diferentes anillos y los diferentes cambios de eterificación según el grupo aromático, los desplazamientos químicos de C-2 y C-3 del anillo de pirano son aproximadamente de 70 y 78 ppm, respectivamente, mientras que C-2 del anillo de furano aparecen en ~91 ppm y C-3 aparece en ~71 ppm (Tabla **XXV**).

Todos estos datos permitieron confirmar las estructuras propuestas que corresponden a compuestos aromáticos prenilados, derivados del ácido benzoico. Sus estructuras fueron nombradas de acuerdo con su aislamiento previo como, 3-hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**1**), 2-(2-hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (**2**), benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo (**3**) y 3-acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**4**) (Arriaga-Giner, 1988; Ren, et al., 2020).

Es importante enfatizar el aislamiento de los compuestos **1–4** quienes conforman 4 de los 5 compuestos mayoritarios obtenidos de las hojas de *E. trichocalyx*. Como se mencionó previamente, los compuestos **1–3** fueron aislados por primera de *Eriodictyon sessilifolium*, pero también el compuesto **1** se encuentra en la especie *Piper dilatolum* (Terreaux y Hostettmann, 1998), el **2** en *Piper aduncum* (Orjala et al., 1994) y el **3** en *Pandanus odoratissimus* (Jong y Chau, 1998).

El compuesto **2**, es un éster metílico del ácido anodendroico que fue aislado por primera vez por Shima y colaboradores (1972) a partir de *Anodendron affine* (Apocynaceae). El compuesto **4**, hasta ahora sólo se ha reportado como un producto sintético, aquí es reportado por primera vez como un nuevo de producto natural.

Arriaga-Giner (1988) menciona que Diaz y colaboradores (1987) también aislaron a un derivado del ácido benzoico disustituido, formando un anillo de cromano de la especie *Piper hostmannianum*, por lo cual, esta coincidencia es importante dado que se puede especular sobre una posible relación entre estos dos géneros de familias diferentes. Por otra parte, el aislamiento del compuesto **3** podría confirmar la teoría de Arriaga-Giner de que podría actuar, a partir de una ciclización, como un precursor en la biosíntesis de los compuestos **1** y **2**.

Para poder entender las diferencias entre los resultados obtenidos de la fitoquímica de *E. trichocalyx* en esta investigación con los reportados por Bohm y Constant (1990), Maher y colaboradores (2020) y Wang y colaboradores (2023) es importante identificar los factores que pueden influenciar sobre esta misma.

Comenzando con el efecto que una metodología de extracción puede tener sobre la composición de un extracto. Como ya sabemos, los PN pueden ser extraídos a partir de distintas técnicas y solventes; y la naturaleza química del solvente a utilizar es crucial para favorecer la solubilidad del extracto debido a las interacciones desarrolladas entre los compuestos del extracto y el solvente (Lefebvre *et al.*, 2021).

Una vez establecido esto, si comparamos los métodos de extracción reportados anteriormente con los nuestros (extracción por decocción), podemos observar que ellos trabajaron con solventes de menor polaridad (Ver apartado **1.5. Estudios químicos de *E. trichocalyx***), obteniendo en su mayoría flavonoides. Según Tzanova y colaboradores (2020) mencionan que para obtener extractos ricos en flavonoides, lo ideal es trabajar con alcoholes como disolventes de extracción y altas temperaturas. Aunque también establece que el solvente a utilizar va a depender de la polaridad del flavonoide a extraer. En caso de trabajar con flavonoides menos polares, Disolventes como la acetona, cloroformo o CH_2Cl_2 serán los adecuados (en armonía con las técnicas utilizadas en las investigaciones pasadas de *E. trichocalyx*). Lo anterior, podría, parcialmente, explicar por qué no se aislaron flavonoides del extracto acuoso.

Un último aspecto importante a considerar es el sitio de extracción y el papel que este tendrá sobre la ecología química de la planta. El sitio de extracción es relevante debido a que cada zona de recolección presenta características específicas de temperatura, suelo, acceso a agua, nutrientes, luz, etc., (factores abióticos), así como también factores bióticos como la competencia, la depredación y agentes patógenos. Estos factores de estrés han permitido que las plantas desarrollen alternativas de defensa que les permite afrontar dichas condiciones; y dependiendo del grado de estrés al que estén expuestas, pueden desarrollar no solo una mayor o menor cantidad de productos naturales, sino que también una composición química distinta (Khare *et al.*, 2020). Por lo cual, es común encontrar distintos compuestos o proporciones de estos mismos entre una misma especie como lo pudimos observar en esta investigación.

Tabla XXV. Datos espectroscópicos de RMN ^1H Y ^{13}C para los compuestos **1-4**.

No.	1		2		3		4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	123.0	-	123.5	-	122.2	-	122.5	
2	133.1	7.80 (sa)	127.6	7.82 (d, 1.5)	134.3	7.88 (d, 2.3)	131.9	7.78 (d, 2.2)
3	121.3	-	129.4	-	128.2	-	118.1	
4	159.0	-	165.7	-	161.9	-	157.0	
5	118.0	6.82 (d, 8.5)	109.7	6.67 (d, 2.3)	116.0	6.84 (d, 8.5)	117.3	6.85 (d, 8.6)
6	130.2	7.77 (dd, 8.5, 2.1)	131.9	7.81 (dd, 8.3, 1.9)	130.6	7.76 (dd, 8.5, 2.2)	129.7	7.82 (dd, 8.5, 2.2)
1' a	31.9	2.80 (dd, 16.8, 7.0)	30.8	3.21 (dd, 9.0, 3.3)	33.9	2.59 (dd, 14.0, 10.3)	28.3	2.83 (dd, 17.3, 5.0)
1' b		3.09 (dd, 16.8, 5.1)				3.05 (dd, 14.0, 2.0)		3.16 (dd, 17.2, 5.0)
2'	69.9	3.82 (dd, 7.0, 5.1)	91.7	4.68 (dd, 9.3, 8.5)	79.6	3.63 (dd, 10.3, 2.0)	70.5	5.05 (t, 4.5)
3'	79.2	-	72.4	-	73.9	-	76.2	
4'	21.5	1.32 (s)	25.2	1.26 (s)	25.1	1.26 (s)	23.1	1.33 (s)
5'	25.9	1.38 (s)	25.3	1.21 (s)	25.6	1.27 (s)	25.0	1.36 (s)
6'	168.6	-	168.7	-	169.0	-	167.0	
7'	-	-	-	-	-	-	170.5	
8'	-	-	-	-	-	-	21.1	2.06 (s)
-	52.3	3.88	52.3	3.84	52.2	3.86 (s)	51.9	3.87 (s)
OCH₃								

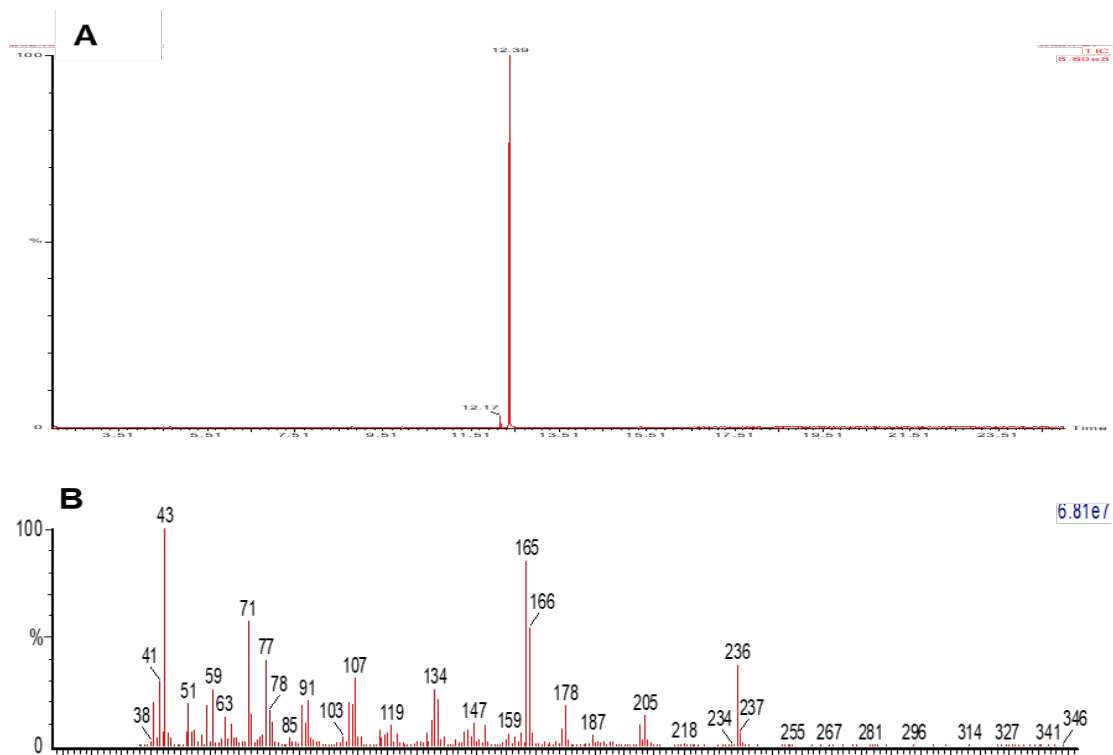


Figura 30. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y **B)** espectro de masas por IE del compuesto 1.

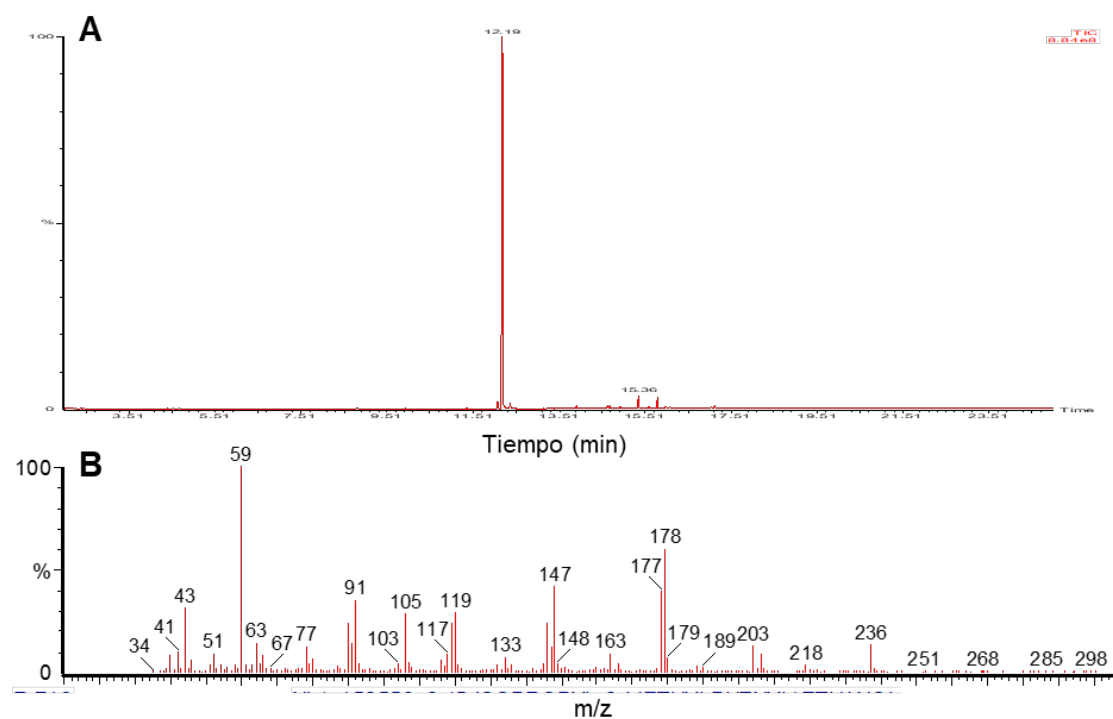


Figura 31. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y **B)** espectro de masas por IE del compuesto 2.

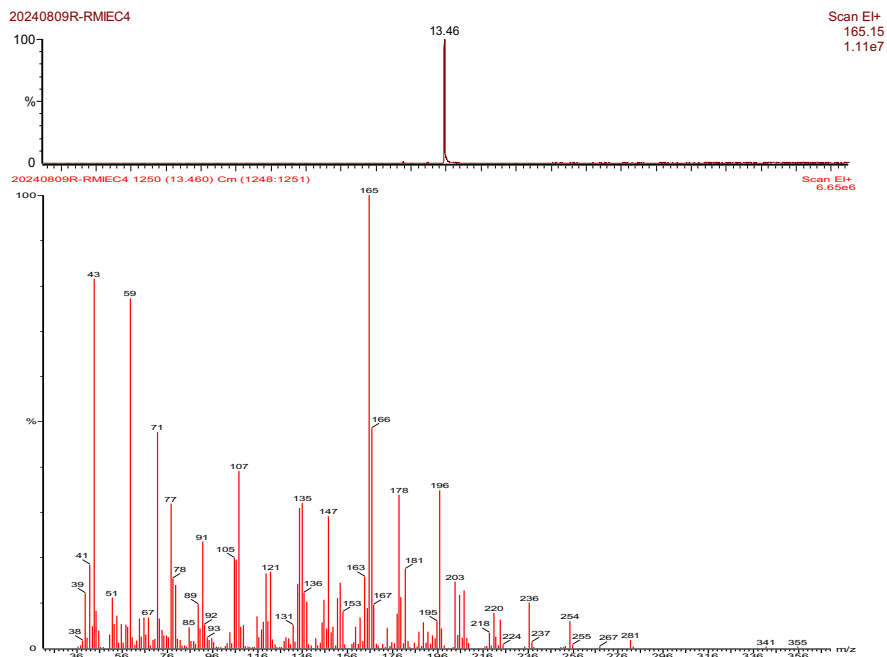


Figura 32. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y **B)** espectro de masas por IE del compuesto 3.

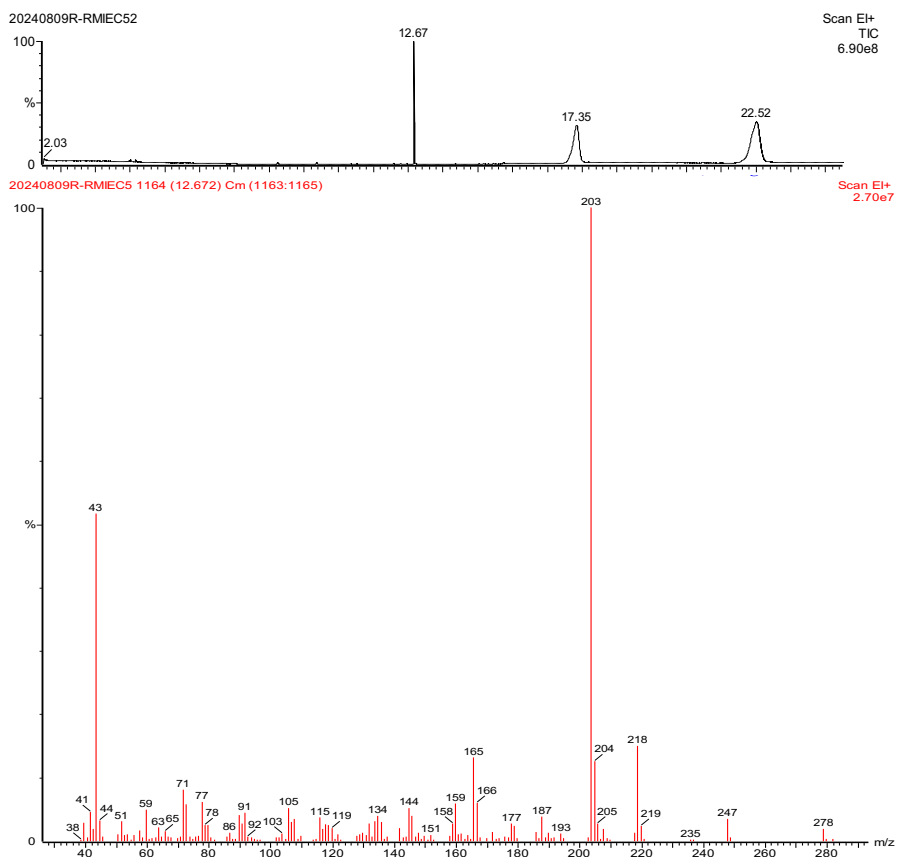


Figura 33. A) Cromatograma iónico total por CG-EM y **B)** espectro de masas por IE del compuesto 4.

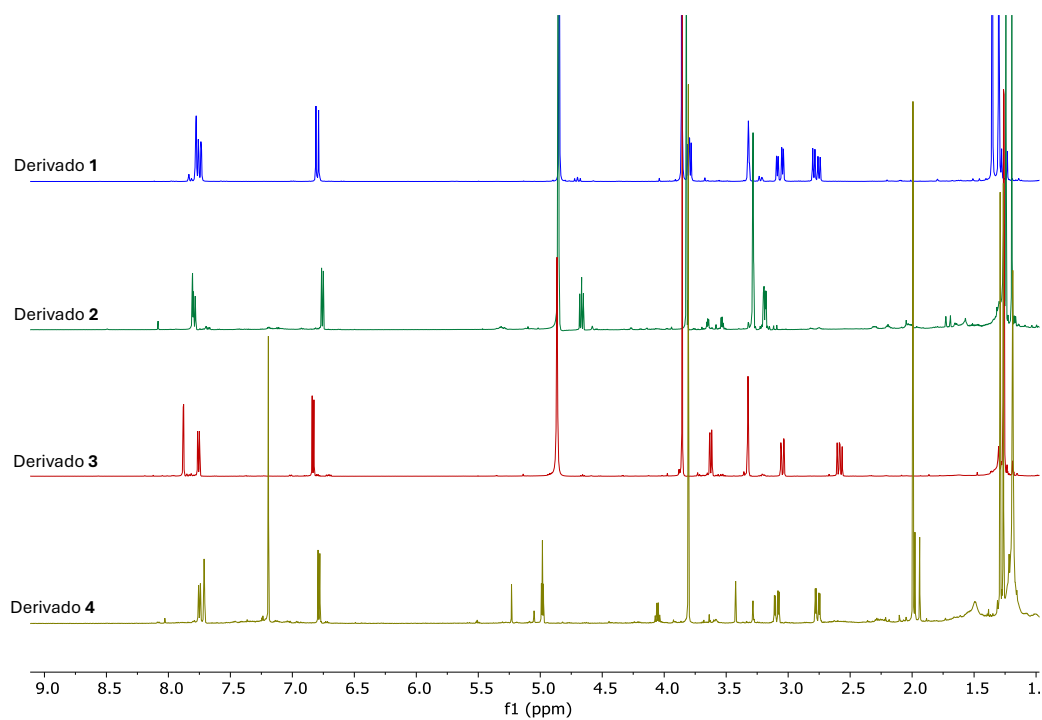


Figura 34. Espectros de RMN de ^1H de los derivados del ácido benzoico (400 MHz, **1–3** están en CD_3OD y **4** en CDCl_3).

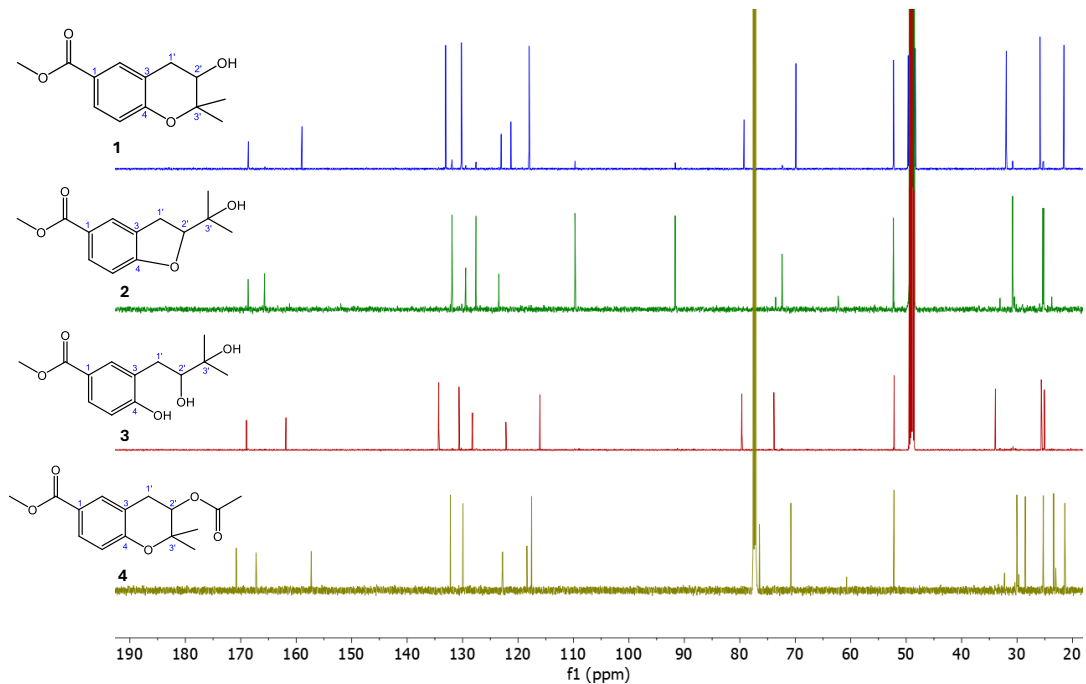


Figura 35. Espectros de RMN de ^{13}C de los derivados del ácido benzoico (100 MHz, **1–3** están en CD_3OD y **4** en CDCl_3).

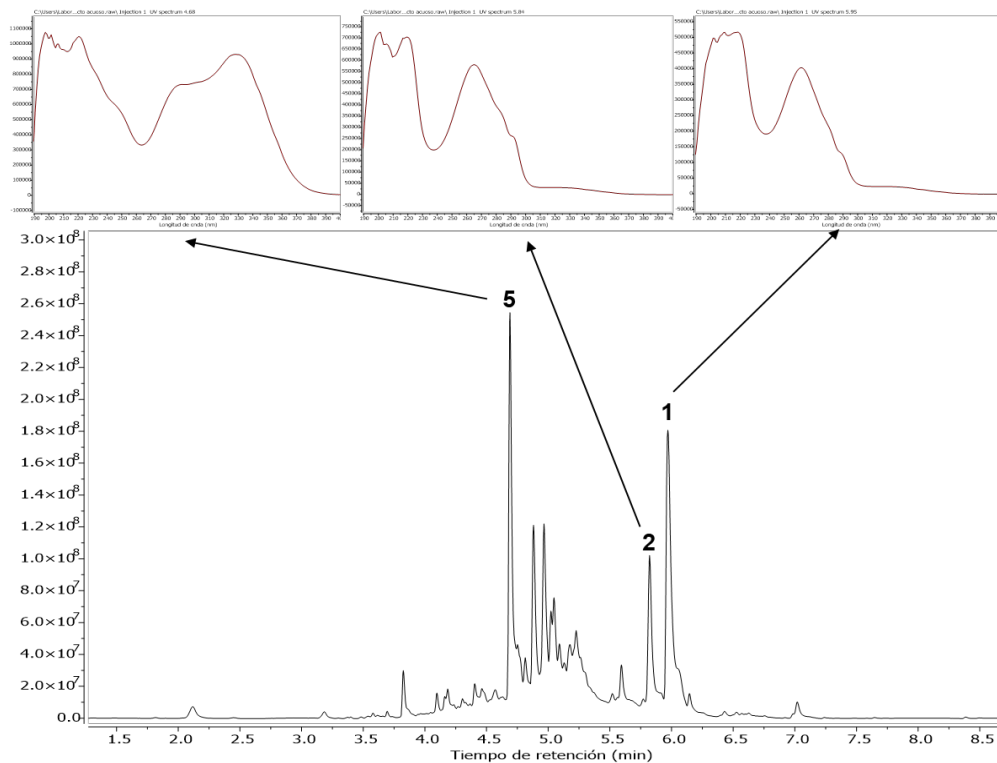


Figura 36. UHPLC-PDA cromatograma (absorbancia total) del extracto acuoso (decocción) de *E. trichocalix*. Se presentan los espectros de UV de tres compuestos mayoritarios aislados, dos derivados del benzoico (**1**, **2**) y del ácido rosmarínico (**5**). Condiciones cromatográficas: ver Parte Experimental.

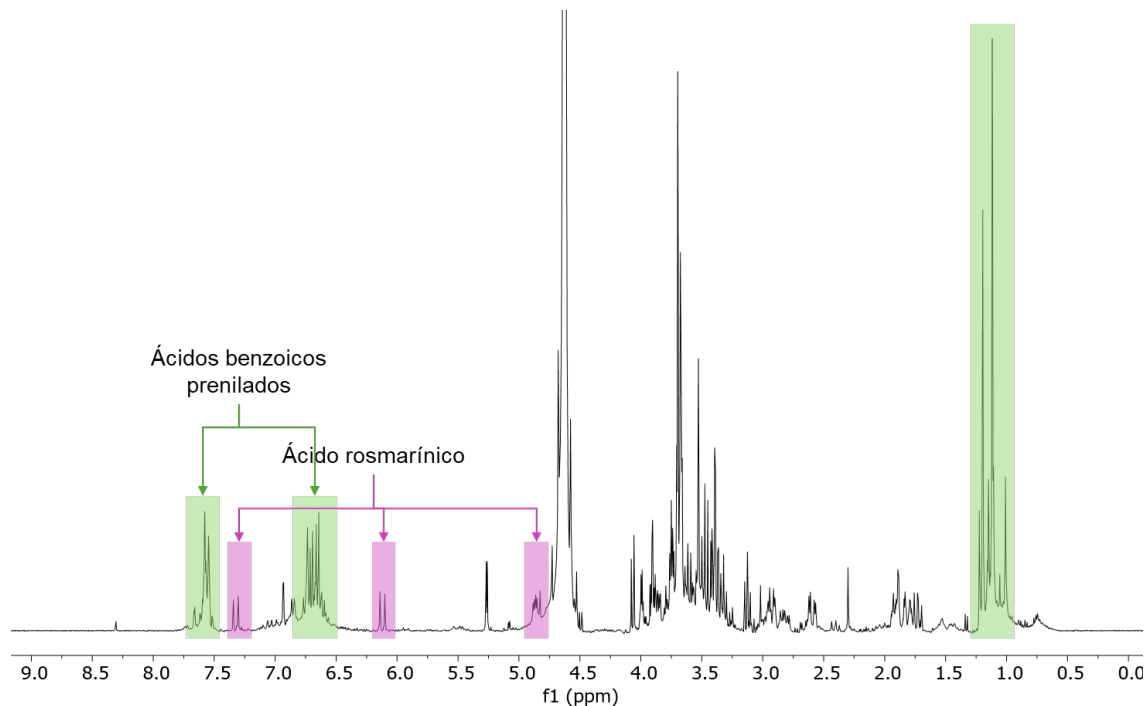


Figura 37. Espectro representativo de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) del extracto acuoso de *E. trichocalix*. Se muestran en color verde las señales diagnósticas para los derivados de ácidos benzoicos prenilados y en color morado para el ácido rosmarínico.

3.6. Obtención de los aceites esenciales y análisis de su composición química

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos del análisis de los aceites esenciales preparados por hidrodestilación, a partir de las hojas secas y frescas de *E. trichocalyx*. Los presentes resultados reflejan una primera aproximación al estudio de los componentes volátiles de la especie *E. trichocalyx* y el género *Eriodictyon*. En la **Figura 38** se observa el el cromatograma iónico por CG-EM que corresponde a los perfiles de los aceites esenciales de las hojas frescas y secas de *E. trichocalyx*. En la **Tabla XXVI** se observan los metabolitos identificados, incluyendo su porcentaje relativo (%), índices de retención calculados (IR) y los reportados por el NIST (IR NIST). En el aceite esencial de la hoja fresca, se identificaron un total de 38 metabolitos, con una representación del 62.29% del total de metabolitos detectados. En el caso de la hoja seca, se identificaron un total de 27 metabolitos, con una representación del 72.43%.

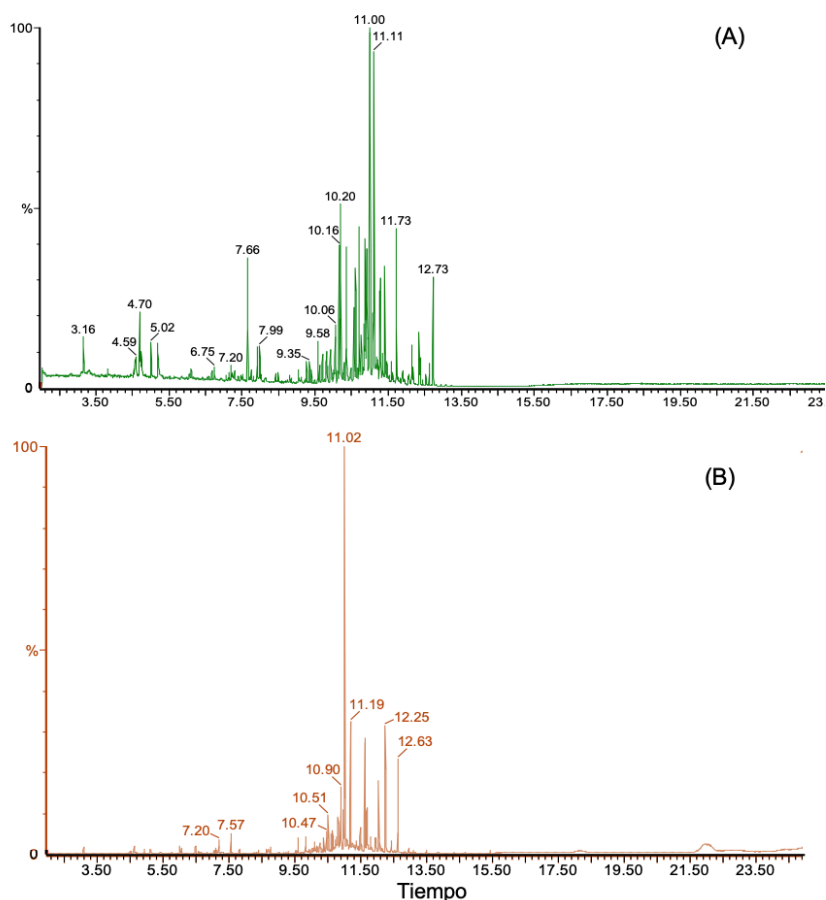


Figura 38. Cromatograma iónico por CG-EM de los aceites esenciales de las hojas frescas (A) y secas (B) de *E. trichocalyx*.

Tabla XXVI. Compuestos identificados en el aceite esencial de *E. trichocalyx* por CG-EM.

No	Compuestos	Fórmula mínima	I _R Calc	I _R Nist	Fresca (%)	Seca (%)
1	Metil-isobutilcetona	C ₆ H ₁₂ O	741	740	0.6289	-
2	Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	764	763	5.0811	5.2404
3	Etilbenceno	C ₈ H ₁₀	861	-	-	0.8092
4	(<i>E</i>)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	863	861	0.2111	-
5	Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	878	874	0.8724	-
6	<i>o</i> -Xileno	C ₈ H ₁₀	894	891	0.8628	1.0904
7	Benzaldehído	C ₇ H ₆ O	971	968	0.1694	-
8	6-metil-5-hepten-2-ona	C ₈ H ₁₄ O	990	986	0.2638	0.5909
9	6-metil-5-hepten-2-ol	C ₈ H ₁₆ O	990	993	-	0.4169
10	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	1040	1039	0.0429	-
11	Alcohol bencílico	C ₇ H ₈ O	1040	1042	0.0836	0.8096
12	Fenilacetaldéhid	C ₈ H ₈ O	1049	1044	0.3317	0.1761
13	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	1100	1104	0.0795	0.1826
14	6-Metil-3,5-heptadien-2-ona	C ₈ H ₁₂ O	1101	1100	-	0.3633
15	Alcohol fenético	C ₈ H ₁₀ O	1119	1120	0.2291	1.1920
16	α -Camfolenal	C ₁₀ H ₁₆ O	1137	1134	0.0712	-
17	Benzoato de etilo	C ₉ H ₁₀ O ₂	1182	1184	0.2258	-
18	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	1212	1214	0.3710	-
19	Dihidrocinnamato de etilo	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1363	1360	0.2023	-
20	Propionato de lavandulilo	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	1387	1375	0.0286	-
21	(<i>Z</i>)-Ácido cinámico, etil ester	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1391	1381	0.0460	-
22	α -Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	1395	1393	0.3079	-
23	Isobutirato de lavandulilo	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	1430	1435	0.0687	-
24	β -cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	1444	1446	0.7478	-
25	Geranil-acetona	C ₁₃ H ₂₂ O	1447	1451	-	1.4167
26	γ -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	1451	1452	0.3429	-
27	Cinamato de etilo	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1481	1475	0.3977	-
28	α -Selineno	C ₁₅ H ₂₄	1486	1480	0.2177	-
29	γ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	1521	1514	-	0.4904
30	α -muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	1521	1518	1.3792	-
31	δ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	1527	1524	-	1.0838
32	10- <i>epi</i> -Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	1554	1551	-	0.6105
33	Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	1558	1562	-	0.5387
34	Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	1571	1565	3.5449	-
35	Oxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	1597	1593	-	2.0473
36	Espatuleno	C ₁₅ H ₂₄ O	1598	1598	1.7497	1.7647
37	β -Muurolo-4,10(14)-dien-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1637	1635	-	0.7304
38	Óxido de humuleno II	C ₁₅ H ₂₄ O	1641	1652	1.5482	-
39	γ -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1651	1657	3.6163	0.4015
40	τ -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	1658	1665	2.8599	4.3275
41	α -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1673	1677	14.7217	3.9870
42	2,3-Dihidrofarnesol	C ₁₅ H ₂₈ O	1693	1696	10.4332	24.7284
43	(<i>E,E</i>)-Farnesal	C ₁₅ H ₂₄ O	1732	1730	1.6141	-
44	Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	1726	1725	3.1165	10.4732
45	(<i>2E,6E</i>)-farnesato de metilo	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	1779	1789	-	0.5012
46	Benzoato de bencilo	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	1782	1785	0.6531	1.9328
47	Criptomeridiol	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	1807	1807	0.1405	-
48	Acetato de dihidrofarnesilo	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	1809	1805	4.1345	5.7955
49	Ácido farnesoico	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1829	1821	0.9043	-
50	Acetato de farnesilo	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	1832	1834	-	0.7373
51	<i>cis</i> -Cinamato de bencilo	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	1960	1958	-	0.7637
Total					62.29	72.43

Los metabolitos hallados en mayor proporción para los AE de hoja fresca y seca fueron el α -eudesmol (14.72% y 3.99%), el 2,3-dihidrofarnesol (10.43% y 24.73%), el farnesol (3.12% y 10.47%), γ -eudesmol (3.62% y 0.4015) y el acetato de dihidrofarnesilo (4.13% y 5.8%) respectivamente. Representando así el 54.95% del aceite esencial de hoja seca, mientras que para el aceite esencial fresco se detectó también el elemol (3.54%), representando así el 47.51% del total de metabolitos identificados en la hoja fresca (**Figura 39**).

Al comparar los resultados obtenidos del AE de hoja fresca y el de hoja seca podemos inferir que la hoja fresca presenta una mayor diversidad de compuestos; presentando un total de 38 metabolitos en contraste con los 27 presentados en el AE de planta seca (**Tabla XXVI**). Asimismo, presenta también más metabolitos en mayor proporción (**Figura 39**); el AE de hoja fresca presentó un total de 8 metabolitos mientras que el AE de hoja seca presentó un total de 7 metabolitos en mayor proporción. A pesar de esto, la representación porcentual de dichos metabolitos (54.95% AE seco y 47.51% fresco) fue mayor para el AE seco debido a que las proporciones del farnesol (10.47%) y 2,3-dihidrofarnesol (24.73%) del AE seco fue considerablemente más elevado que la del AE fresco (farnesol 3.12% y 2,3- dihidrofarnesol (10.43%).

Estas diferencias de concentraciones se debe a que las plantas secas han perdido, por el propio proceso de secado, metabolitos volátiles y el método de secado influye en cómo y cuanto puede cambiar el contenido de los metabolitos (secado natural) . Mokhtarikhah y colaboradores (2020) indican que los métodos de secado pueden dividirse en a) secado natural y b) secado artificial; mencionado también que el secado natural presenta desventajas como la pérdida de compuestos activos importantes. Khan y colaboradores (2023) también reportan las alteraciones que pueden presentarse en la composición y abundancia de compuestos en los AE, a partir de si el AE se realiza con planta fresca o seca. Mencionan que hay compuestos que tienen mayores concentraciones en caso de prepararse con material fresco y otros que pueden disminuir; sucediendo lo mismo al hablar del material seco. Por ejemplo, ellos mencionan un estudio donde el proceso de secado disminuyó compuestos de tipo monoterpenos y citrales, mientras

que los sesquiterpenos aumentaron. Otro ejemplo que mencionan es un caso con material fresco en donde se aumentaban hidrocarburos terpénicos al mismo tiempo que disminuían concentraciones de alcoholes monoterpénicos y el gingerol. Lo anterior podría explicar las diferencias no solo en la diversidad de metabolitos encontrados entre aceites sino también las diferencias de concentración de cada metabolito.

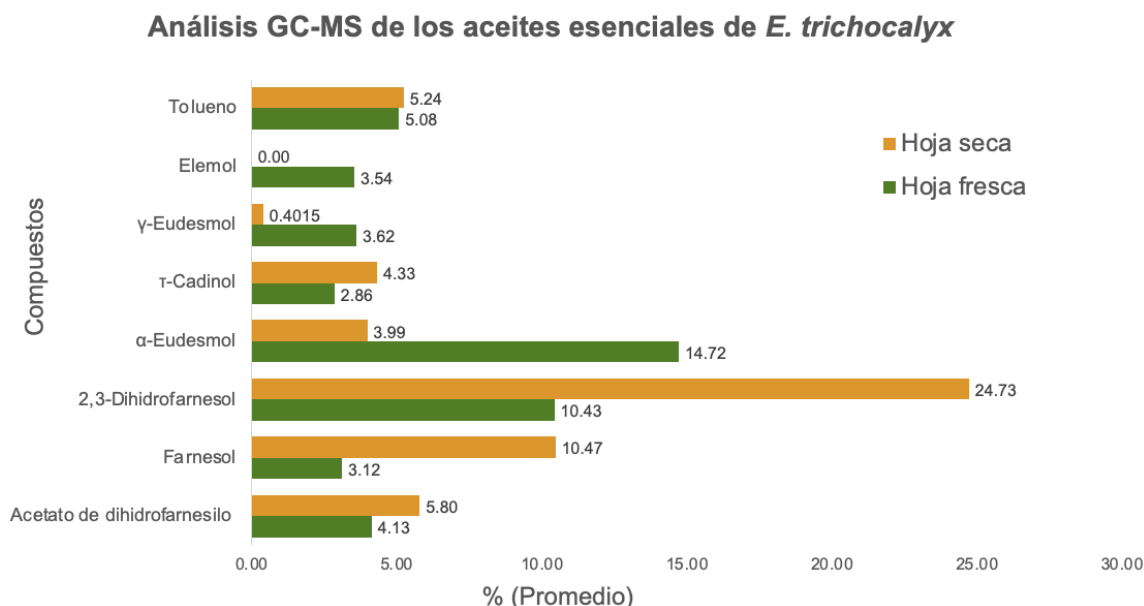


Figura 39. Metabolitos hallados en mayor proporción para los AE de hoja fresca y seca de *E. trichocalyx*.

A continuación se presenta una revisión bibliográfica acerca de la actividad biológica de los compuestos hallados en mayor proporción (**Figura 39**). El **tolueno** fue identificado en ambos aceites esenciales y este puede ser producido de manera natural por las plantas. Anteriormente, se pensaba que la aparición de este compuesto en AE se asociaba con la posible contaminación de estos. Aunque al indagar acerca de su aparición en otros aceites esenciales se identificó que este puede llegar a ser más común de lo esperado. Algunas de las especies en donde se detectó tolueno es *Pinus sylvestris* y *Picea exelsa*, los aceites esenciales de estas plantas (secas) fueron analizados, obteniendo porcentajes relativos de 5 y 2.3% respectivamente (Isidorov et al., 2003). También, el tolueno se encuentra en la especie *Genipa americana* L., con una concentración de 0.01 mg/kg (Pino et al., 2005). Un último ejemplo es presentando por Zhang y colaboradores (2005) en

donde trabajaron con el aceite esencial de *Cynanchum paniculatum* con porcentajes relativos de 0.5 en hojas y 0.7% en raíces. Considerando la aparición de tolueno en los AE de distintas especies de plantas, se puede pensar que su aparición resulta de la naturaleza de la composición química de las especies, más que del resultado de accidentes de contaminación aislados.

El **farnesol** (identificado en ambos AE) un terpeno de 15 carbonos hallado comúnmente en los AE de plantas aromáticas, cuenta con diversas actividades biológicas, entre ellas la antiinflamatoria, la ansiolítica, la antioxidante, la analgésica y la quimiopreventiva (Delmondes *et al.*, 2020). También se ha utilizado para tratar diabetes, asma alérgica, regulación de respuestas inflamatorias, con efectos beneficiosos para el edema y gliosis (Jung *et al.*, 2018). Además de esto, Boone y colaboradores (2023) mencionan que el farnesol y moléculas relacionadas como el **2,3-dihidrofarnesol** (otro de nuestros compuestos mayoritarios) tiene potencial para su uso como antifúngicos. El 2,3-dihidrofarnesol también tiene reportes de actividad antibacterial (Lima *et al.*, 2023).

El compuesto **α -eudesmol** tiene reportes en donde se expone su capacidad de inhibir la inflamación neurogénica. También, a partir de docking molecular, el α -eudesmol y **γ -eudesmol** (junto con otros 18 compuestos) se acoplaron contra la ciclooxigenasa 2, el factor de necrosis tumoral- α y la interlucina-1 β convertasa lo que se asocia con una posible actividad analgésica y antiinflamatoria. De los 20 compuestos trabajados, el α -eudesmol y el γ -eudesmol fueron de los que mostraron un mejor acoplamiento a la ciclooxigenasa 2 y el α -eudesmol fue el compuesto con máxima afinidad a la interlucina-1 β convertasa en comparación con un fármaco sintético (belnacasan) (Mondal *et al.*, 2021). El compuesto γ -eudesmol también tiene reportes de actividad antiprotozoaria y antibacterial (dos Santos *et al.*, 2022).

τ -cadinol es un compuesto presente comúnmente en los AE de plantas aromáticas, está compuesto tiene reportes de distintas actividades biológicas, usándose para el tratamiento de diarrea y heridas. También existen reportes que mencionan al compuesto como un antagonista del calcio, con efectos sobre células dendríticas, y actividad antibacteriana, fungicida e insecticida (Sun *et al.*, 2022).

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados de la evaluación de la toxicidad aguda de la decocción de *E. trichocalyx* en ratones no mostraron alteraciones de conducta, muerte o daño macroscópico. Lo anterior indica que los compuestos mayoritarios del extracto no producen toxicidad.

La evaluación del efecto antinociceptivo mostro que la administración oral del extracto acuoso de *E. trichocalyx*, produce una reducción dosis-dependiente del comportamiento de lamida ($p < 0,05$). La DE_{50} calculada para la decocción de *E. trichocalyx* en la Fase II fue de 55.2 ± 14.7 mg/kg. Estos resultados sugieren el potencial analgésico de *E. trichocalyx* para el tratamiento del dolor inflamatorio agudo.

La decocción de *E. trichoxalyx* no mostro un efecto antiinflamatorio, antihiperalgésico y antinalódínico en las extremidades posteriores tras la inducción de la artritis reumatoide en ratas, lo que sugiere que *E. trichocalyx* no es efectiva para tratar enfermedades que cursan con dolor inflamatorio crónico.

Se aislaron cinco metabolitos mayoritarios de *E. trichocalyx*. El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos permitió confirmar su estructura como 3-Hidroxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**1**), 2-(2-Hydroxiopropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-carboxilato de metilo (**2**), Benzoato de 4-hidroxi-3-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutilo (**3**), 3-Acetoxi-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metilo (**4**) y ácido rosmarínico (**5**). Los compuestos mayoritarios identificados podrían asociarse al efecto antinociceptivo de la decocción de *E. trichocalyx* observado en la prueba de la formalina en contraste con lo esperado de acuerdo con los reportes fitoquímicos previos de la especie.

Los compuestos **1–4** son reportados por primera vez para la especie *E. trichocalyx*; siendo todos estos derivados del ácido benzoico prenilados. El compuesto **4**, hasta ahora sólo se ha reportado como un producto sintético, aquí es reportado por primera vez como un nuevo de producto natural.

Todas las investigaciones que reportaron a los compuestos **1–3** mencionan que estos fueron aislados a partir un mismo extracto, lo que resulta en la deducción

de que el compuesto **3** actúa como un precursor en la biosíntesis de los compuestos **1** y **2** por ciclización.

Se logró realizar el primer estudio de los componentes volátiles de *E. trichocalyx* a partir del análisis de sus aceites esenciales preparados con planta fresca y seca. Los metabolitos hallados en mayor proporción para los AE de hoja fresca y seca fueron el α -eudesmol (14.72% y 3.99%), el 2,3-dihidrofarnesol (10.43% y 24.73%), el farnesol (3.12% y 10.47%), γ -eudesmol (3.62% y 0.4015) y el acetato de dihidrofarnesilo (4.13% y 5.8%) respectivamente. Para el aceite esencial fresco se detectó también el elemol (3.54%).

Una vez que se analizaron los resultados obtenidos de la fitoquímica y actividad biológica de la decocción, podemos inferir que el método utilizado para la preparación del extracto de *E. trichocalyx* en la medicina tradicional para el tratamiento de articulaciones doloridas no es el más adecuado. Esto debido a que los metabolitos de mayor interés farmacológico de acuerdo a este padecimiento, no se logran aislar a partir de dicho método de extracción.

Perspectivas

Evaluar el potencial antinociceptivo de los compuestos mayoritarios aislados de *E. trichocalyx* para determinar así su efecto individual.

Estudiar la fitoquímica de las hojas de *E. trichocalyx*, utilizando métodos de extracción que utilicen solventes de menor polaridad como alcoholes y/o acetona. Y evaluar su efecto antiinflamatorio, antinociceptivo y antihiperalgésico utilizando el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC); para establecer su potencial antiartrítico.

Evaluar el potencial antinociceptivo de los AE de las hojas de *E. trichocalyx* ya que existen reportes de la aplicación de la cataplasma de las hojas de la especie para tratar articulaciones doloridas.

Completar el volatiloema de *E. trichocalyx* con la implementación de la metodología denominada microextracción en fase sólida.

Anexos

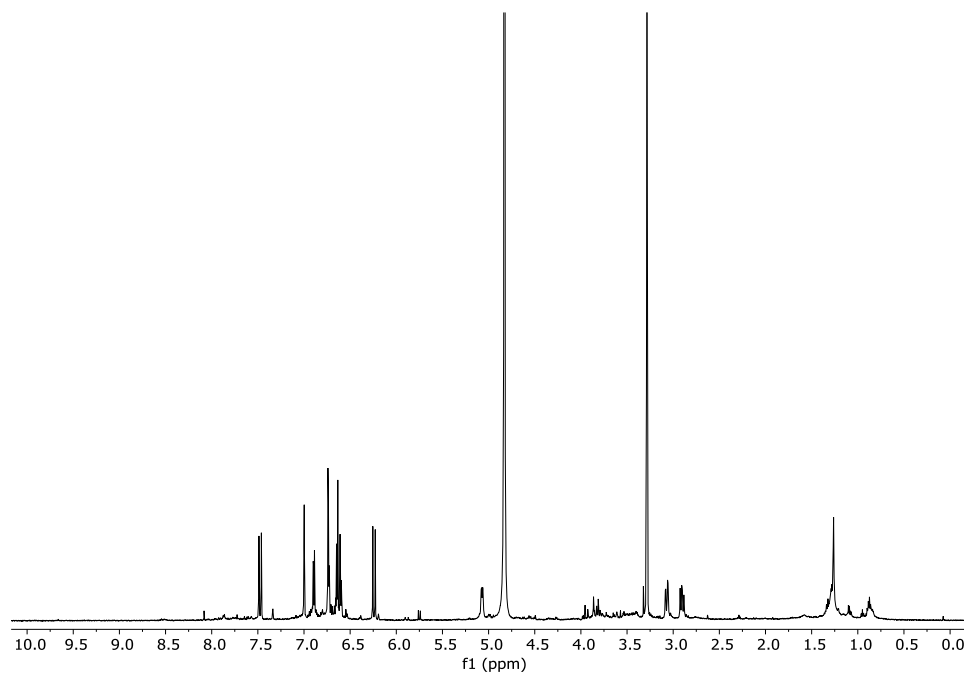


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del ácido rosmarínico (5)

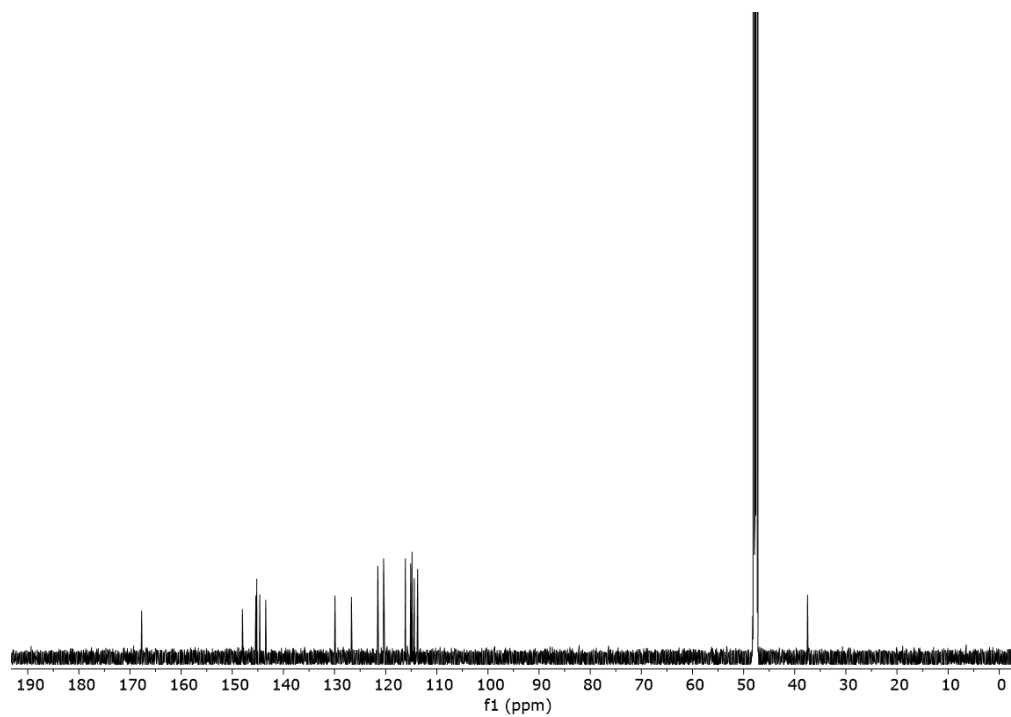


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del ácido rosmarínico (5).

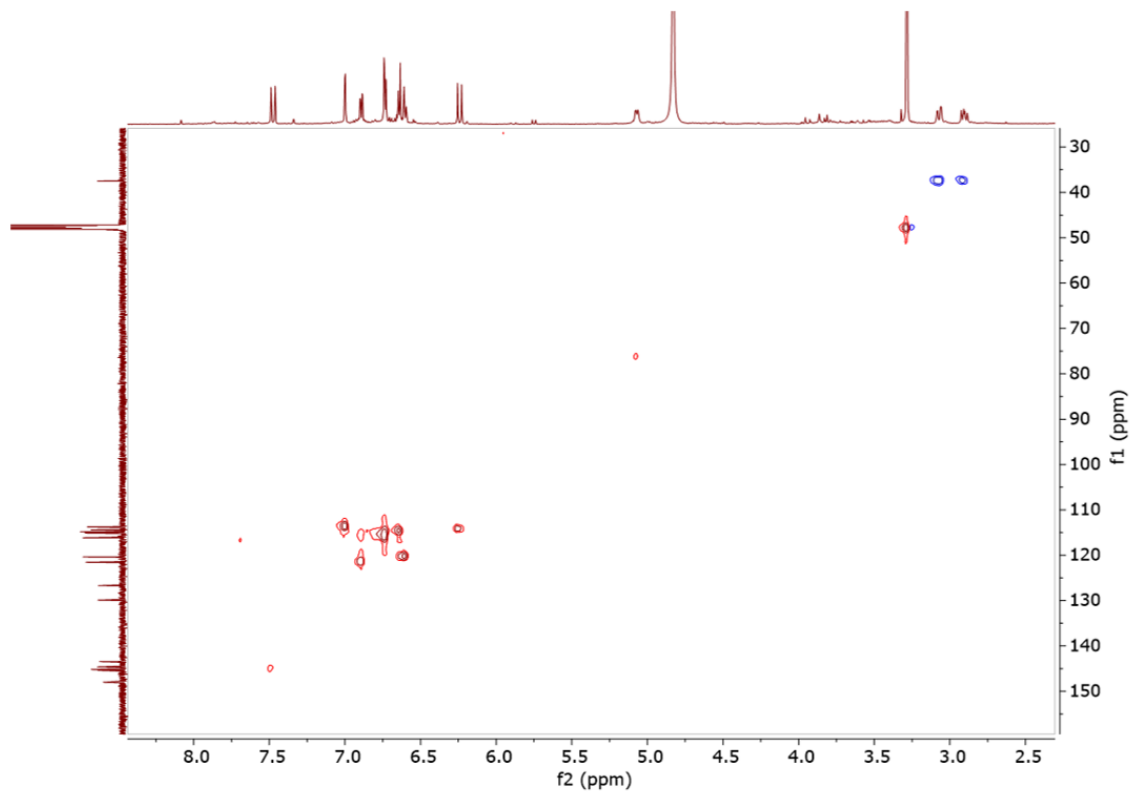


Figura 42. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).

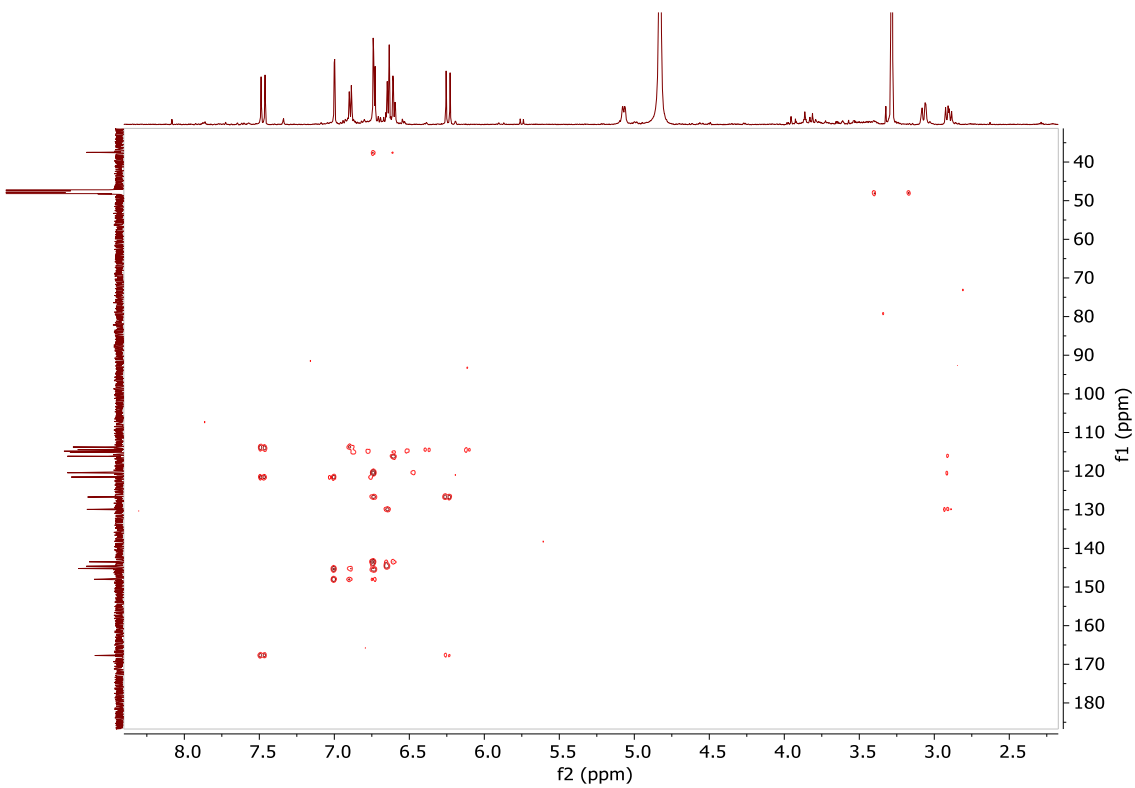


Figura 43. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).

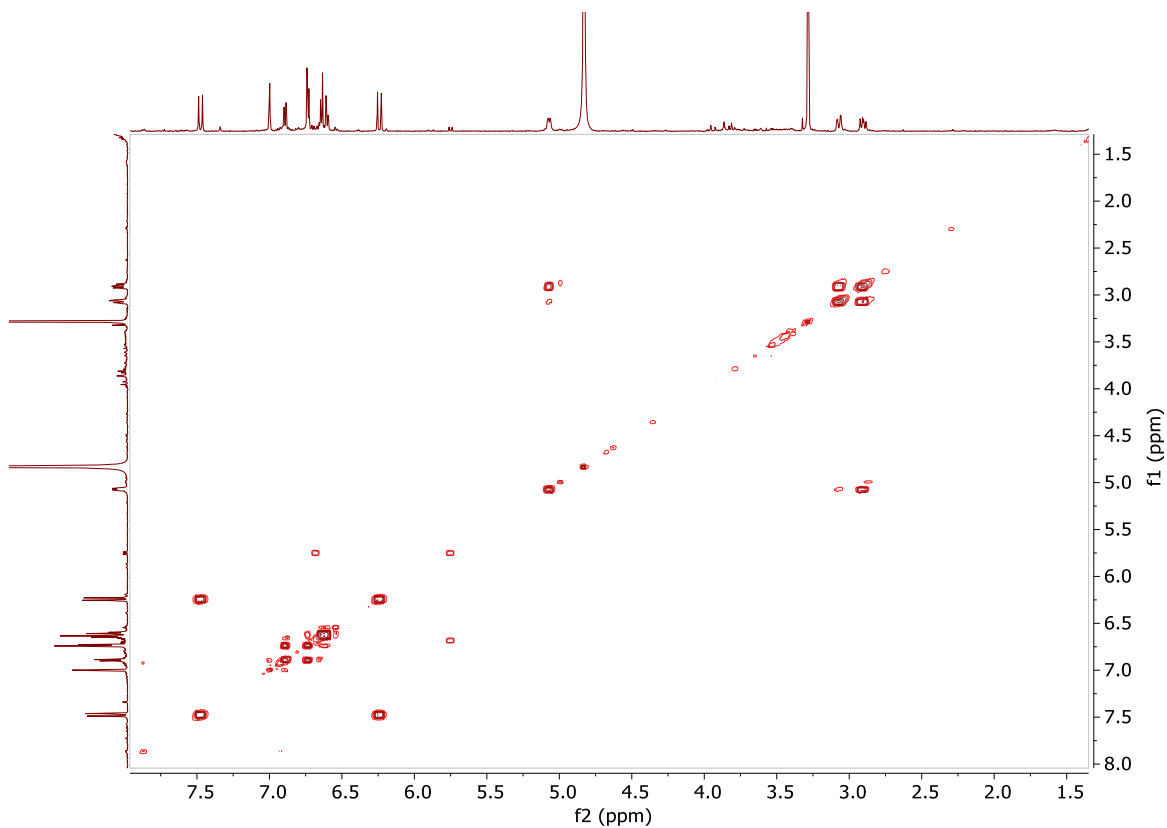


Figura 44. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del ácido rosmarínico (5).

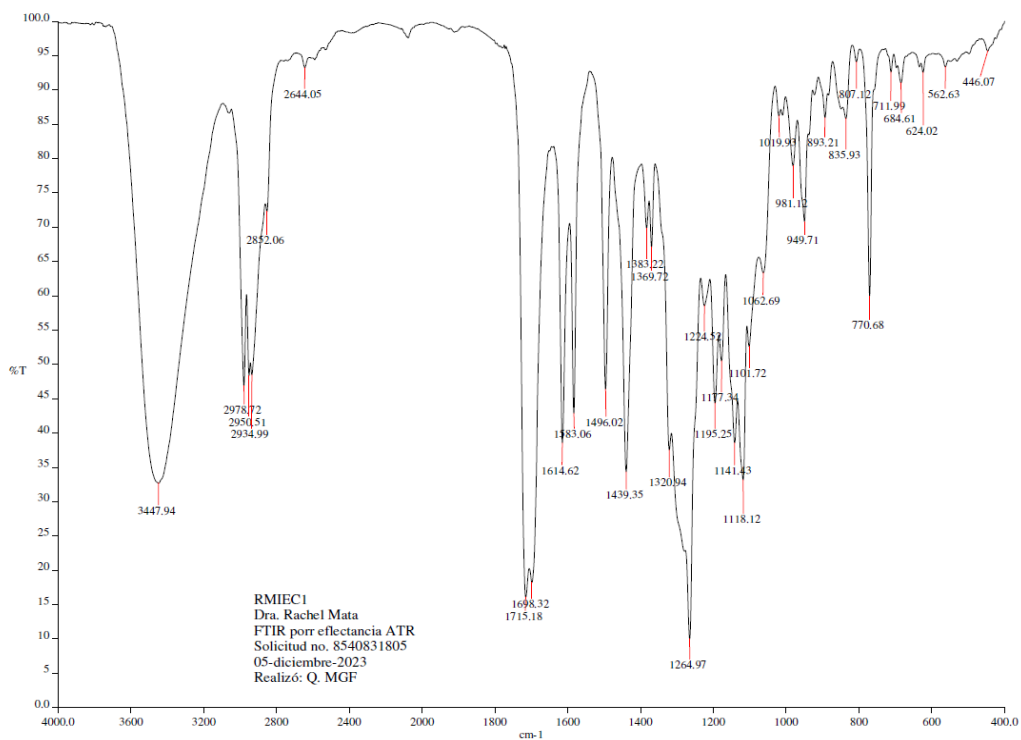


Figura 45. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 1.

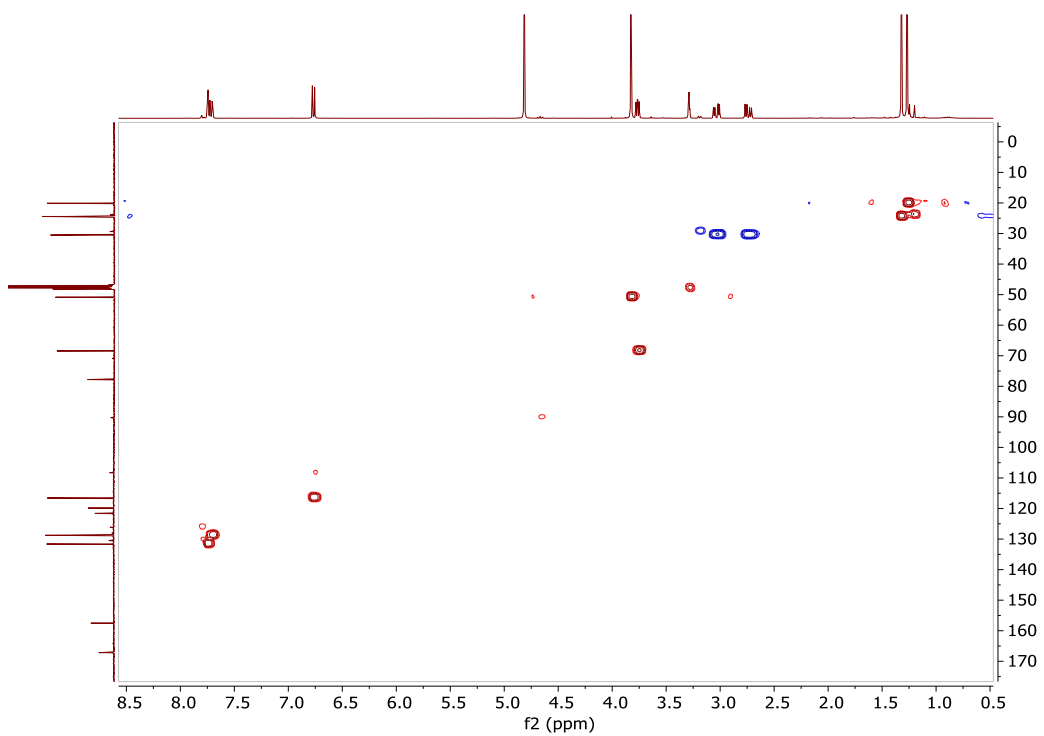


Figura 46. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **1**.

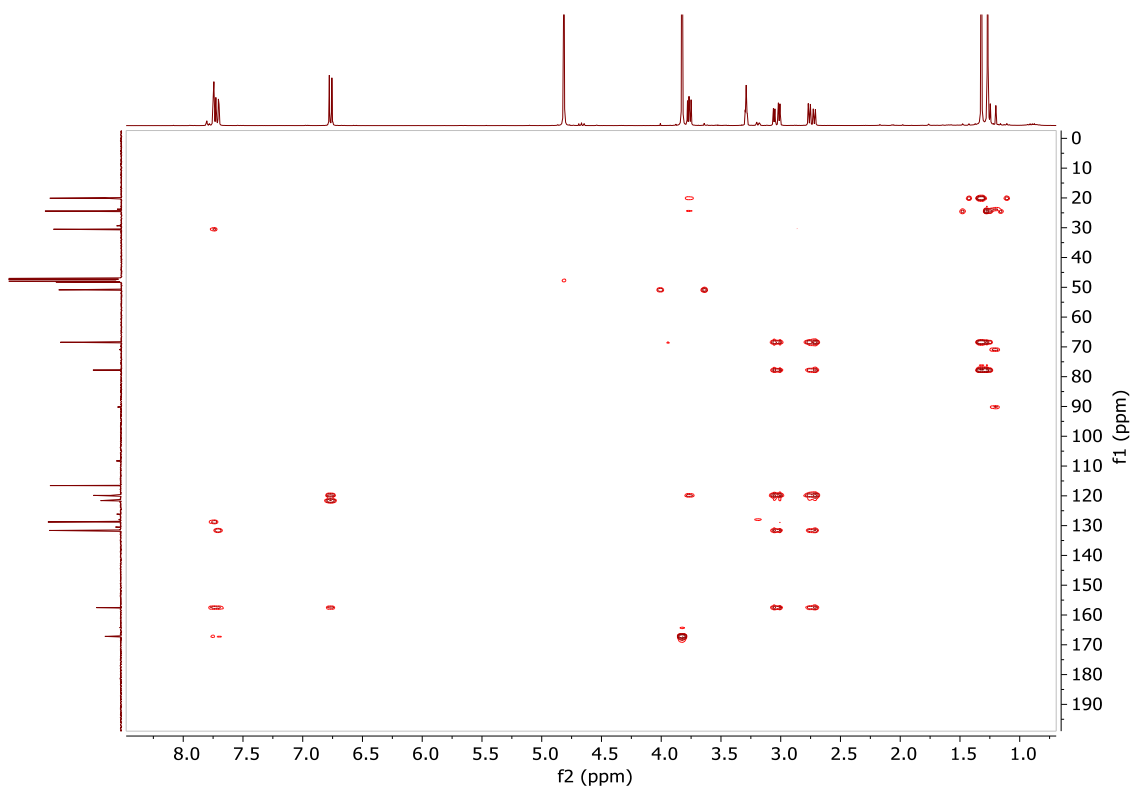


Figura 47. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **1**.

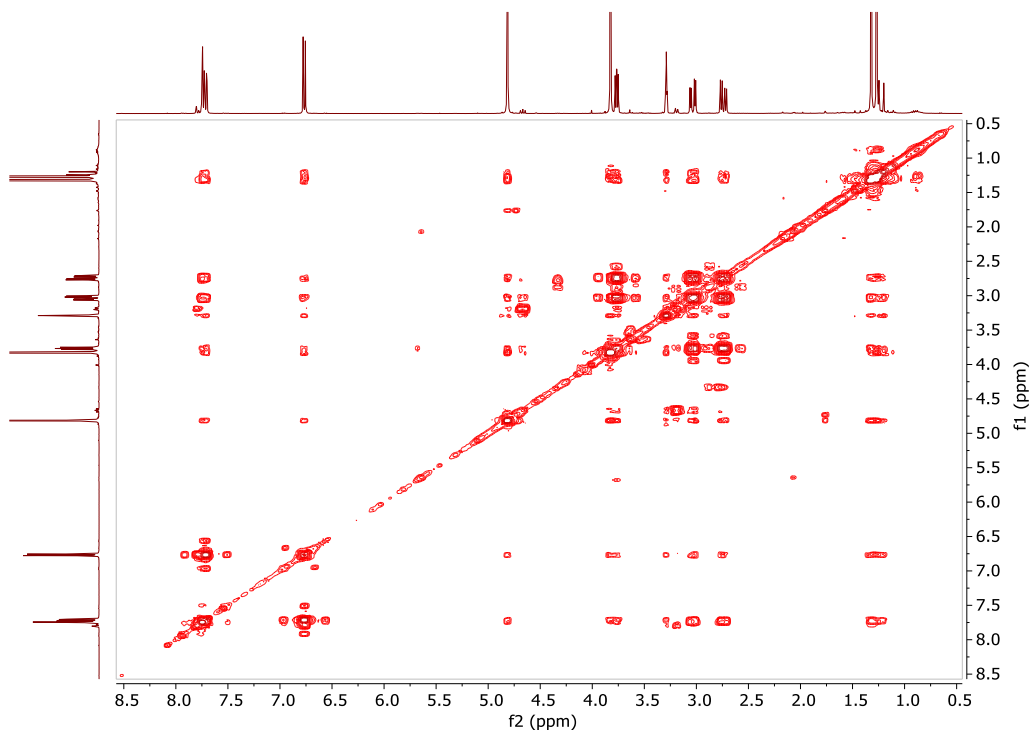


Figura 48. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **1**.

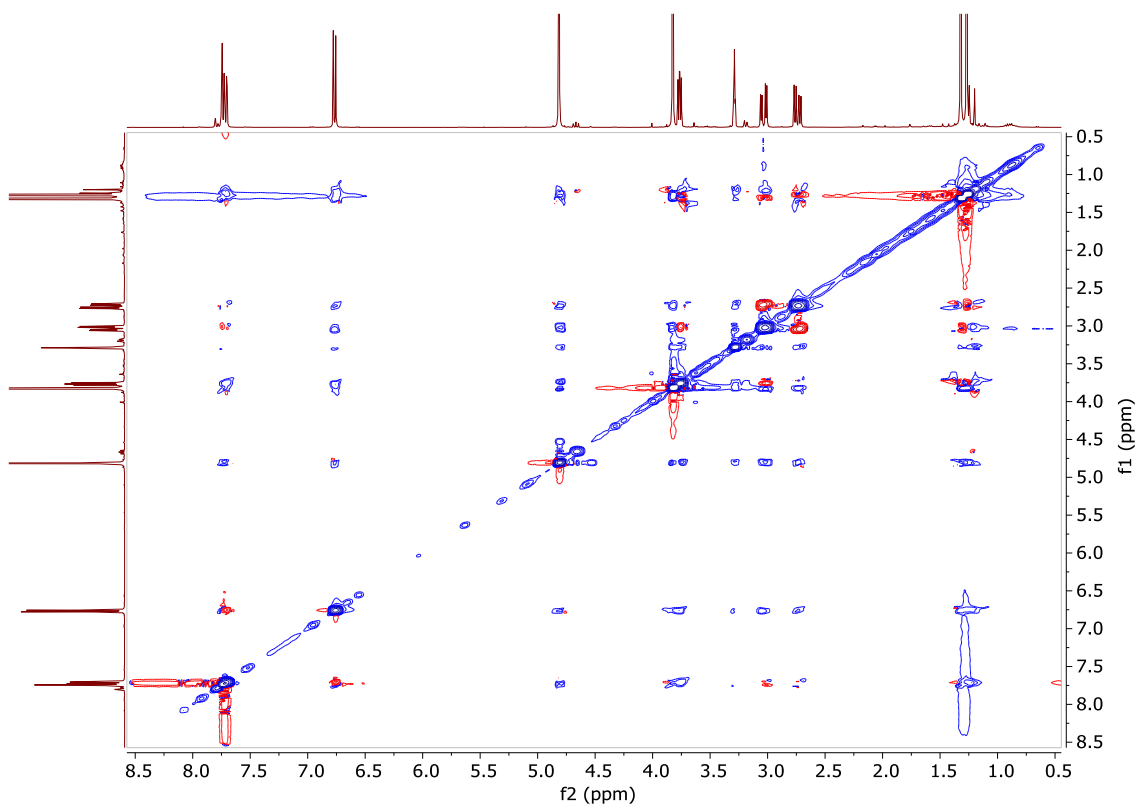


Figura 49. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **1**.

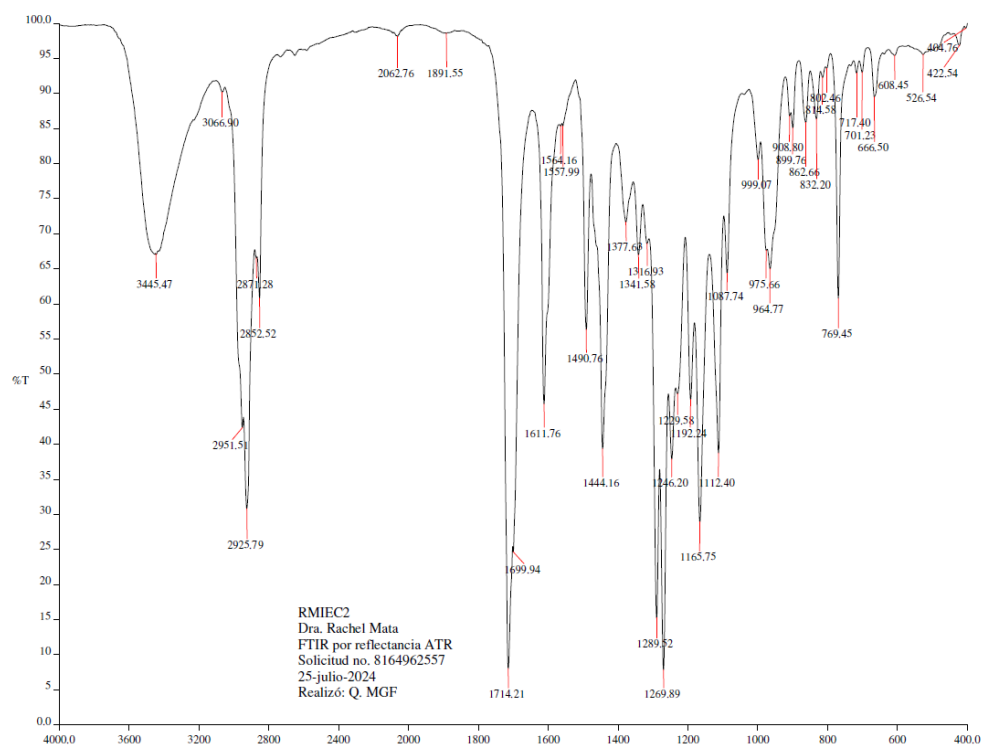


Figura 50. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 2.

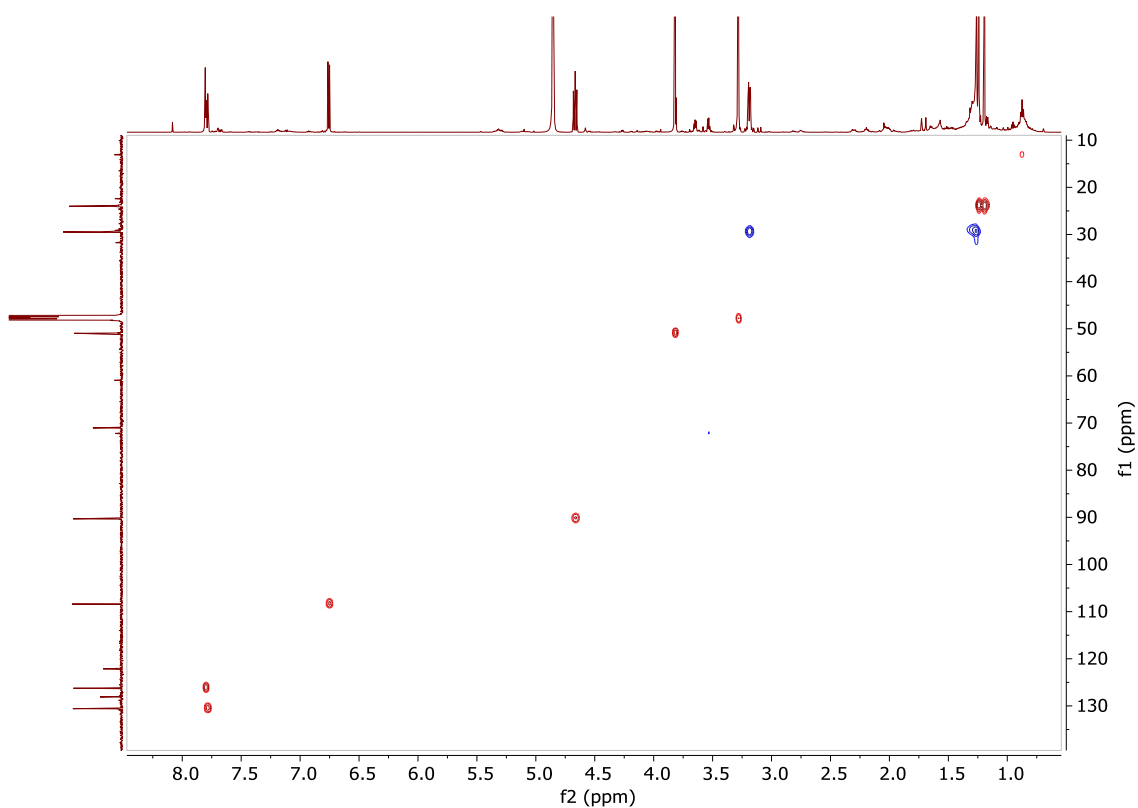


Figura 51. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico 2.

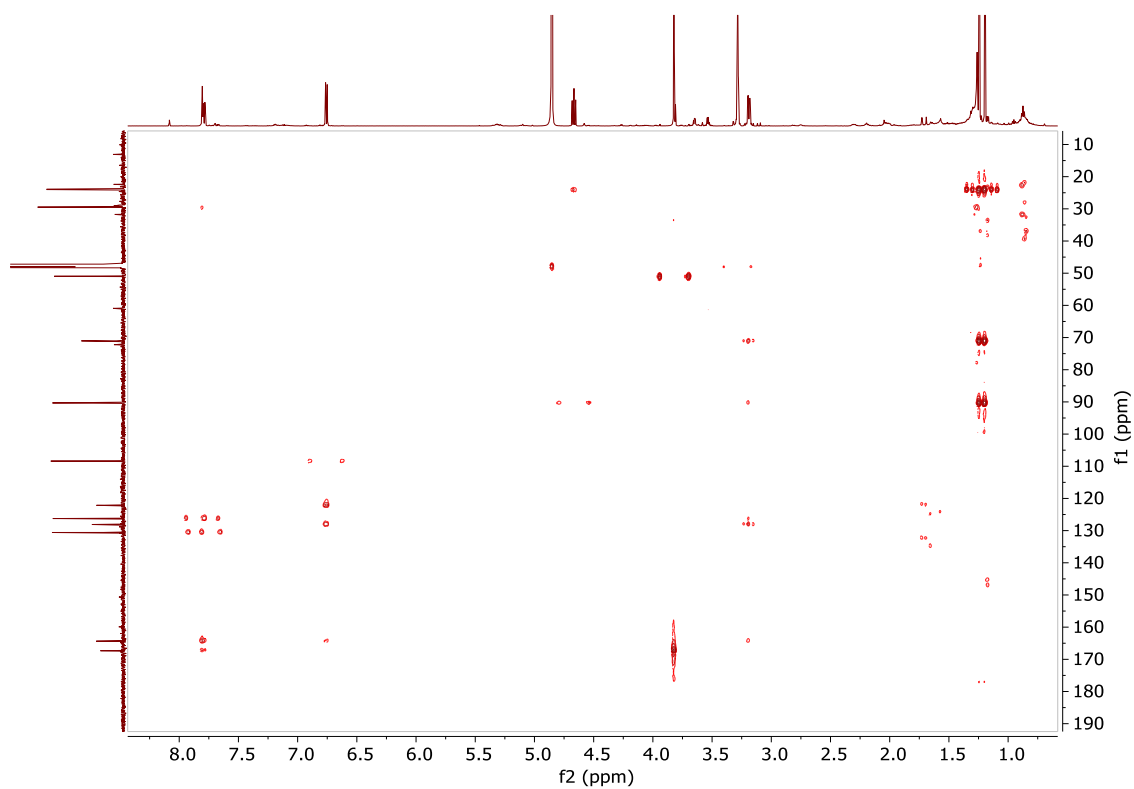


Figura 52. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **2**.

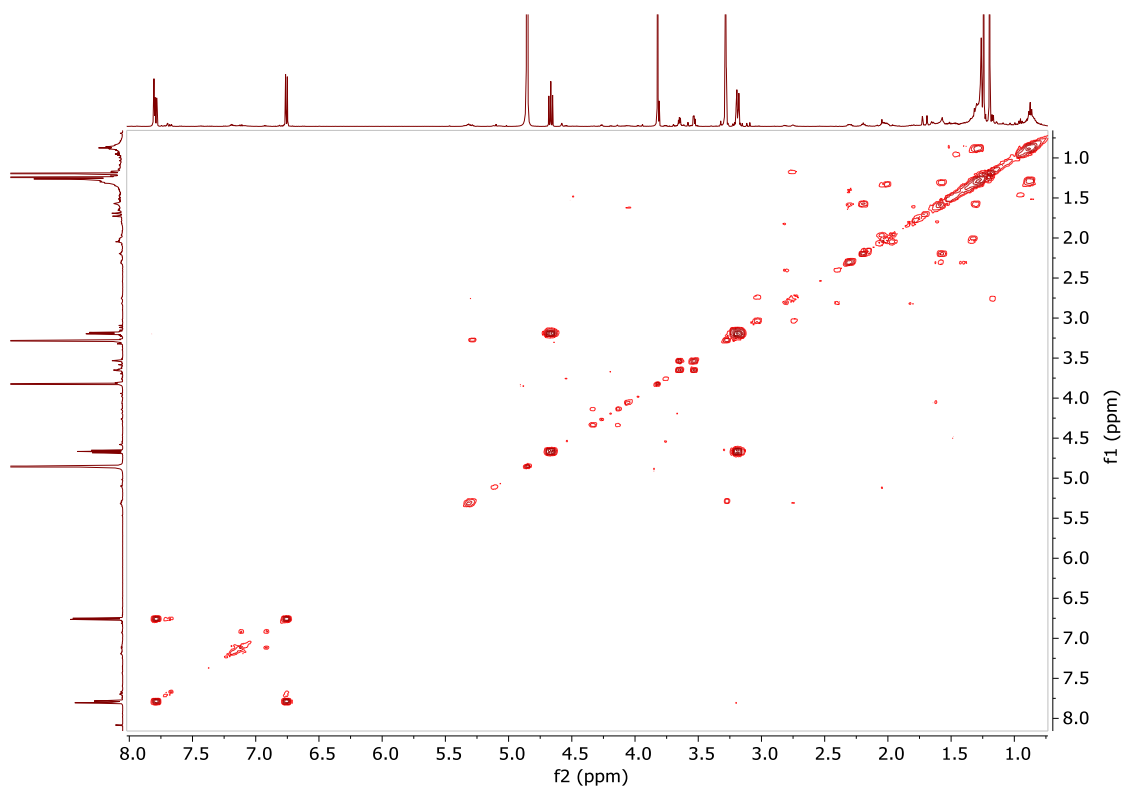


Figura 53. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **2**.

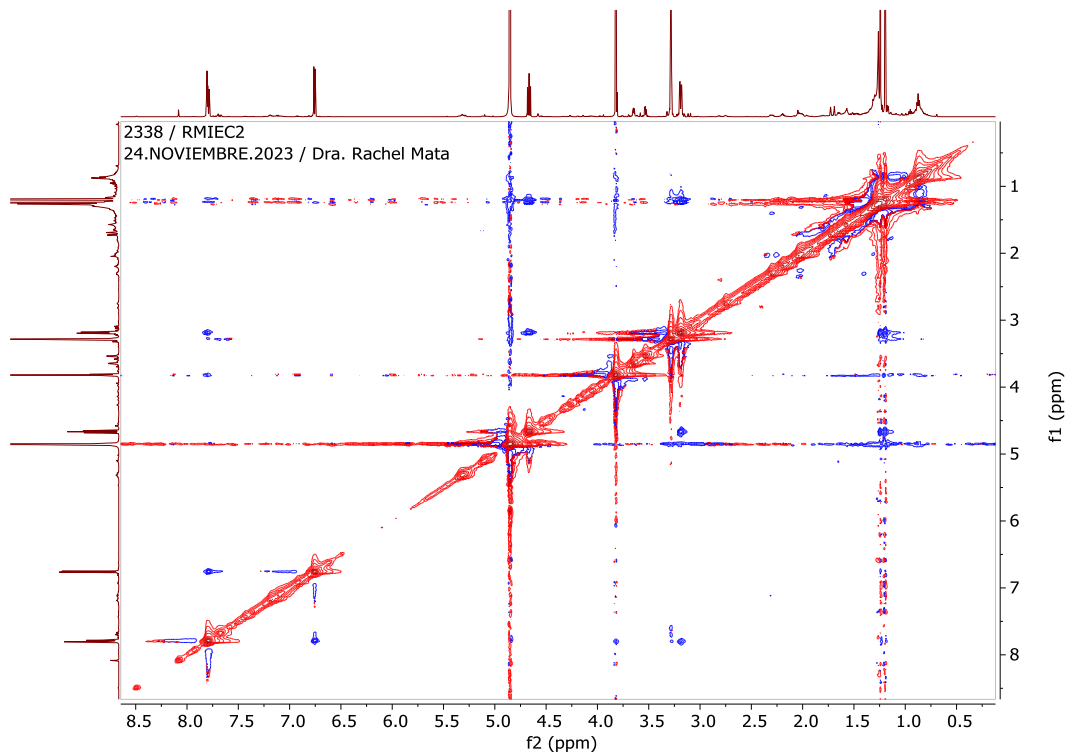


Figura 54. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **2**.

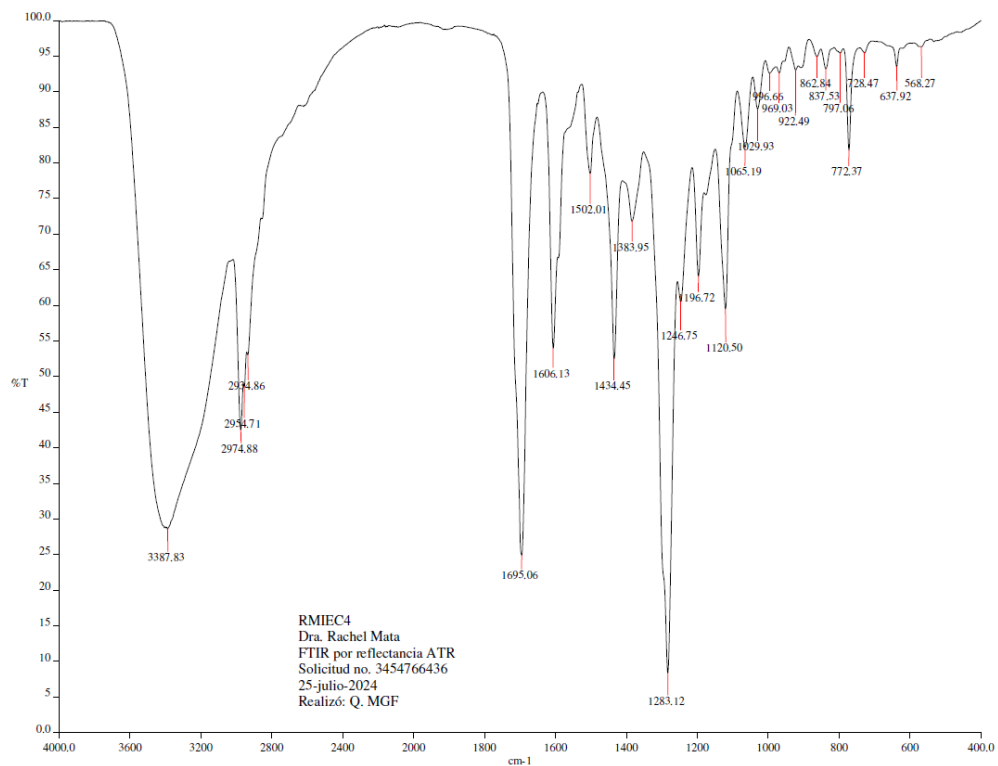


Figura 55. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto **3**.

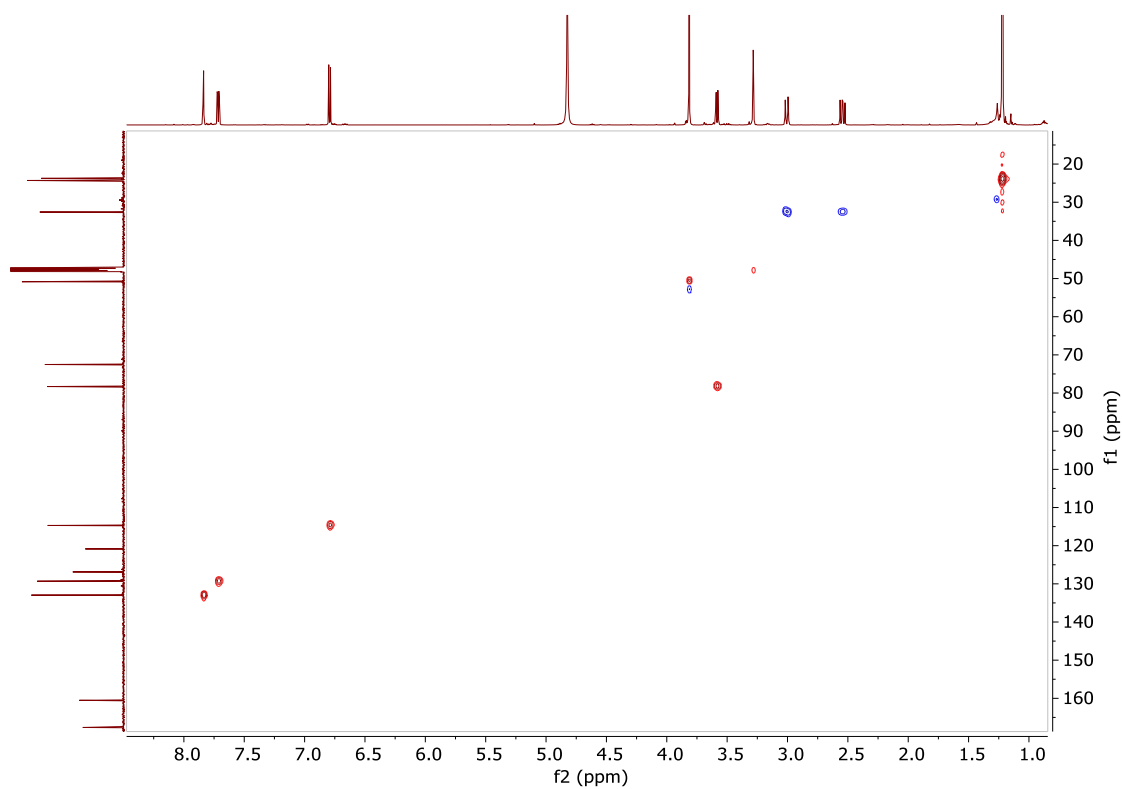


Figura 56. Espectro bidimensional HSQC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **3**.

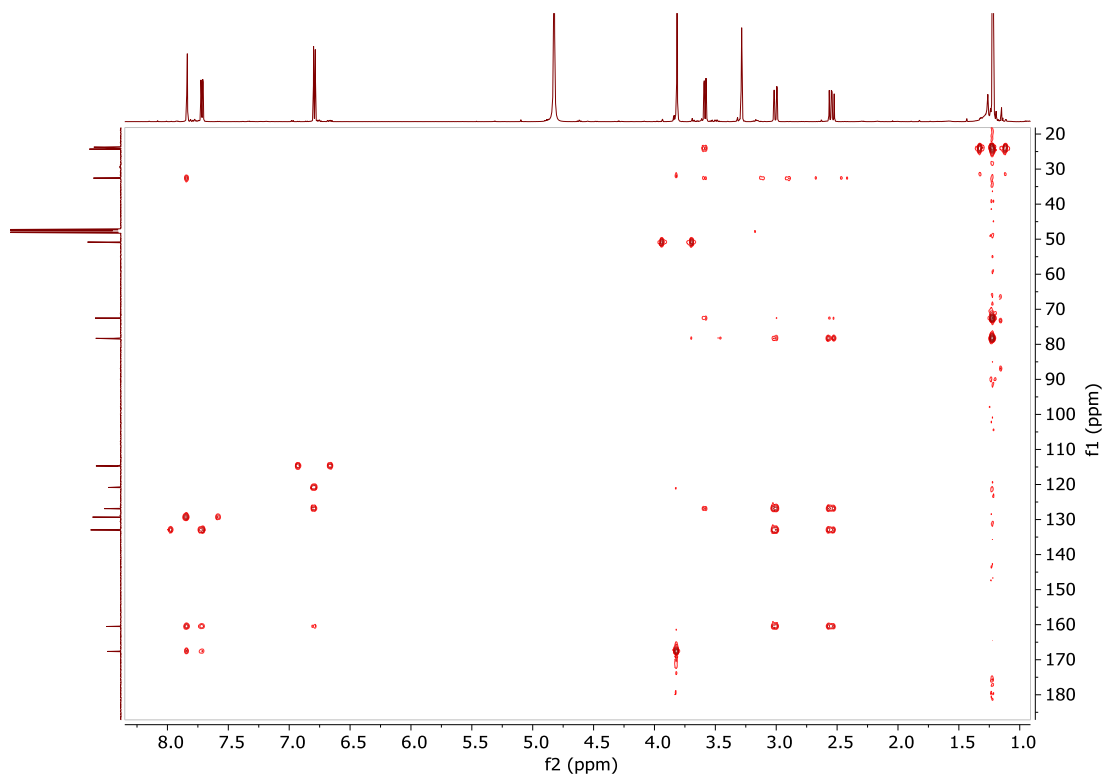


Figura 57. Espectro bidimensional HMBC ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **3**.

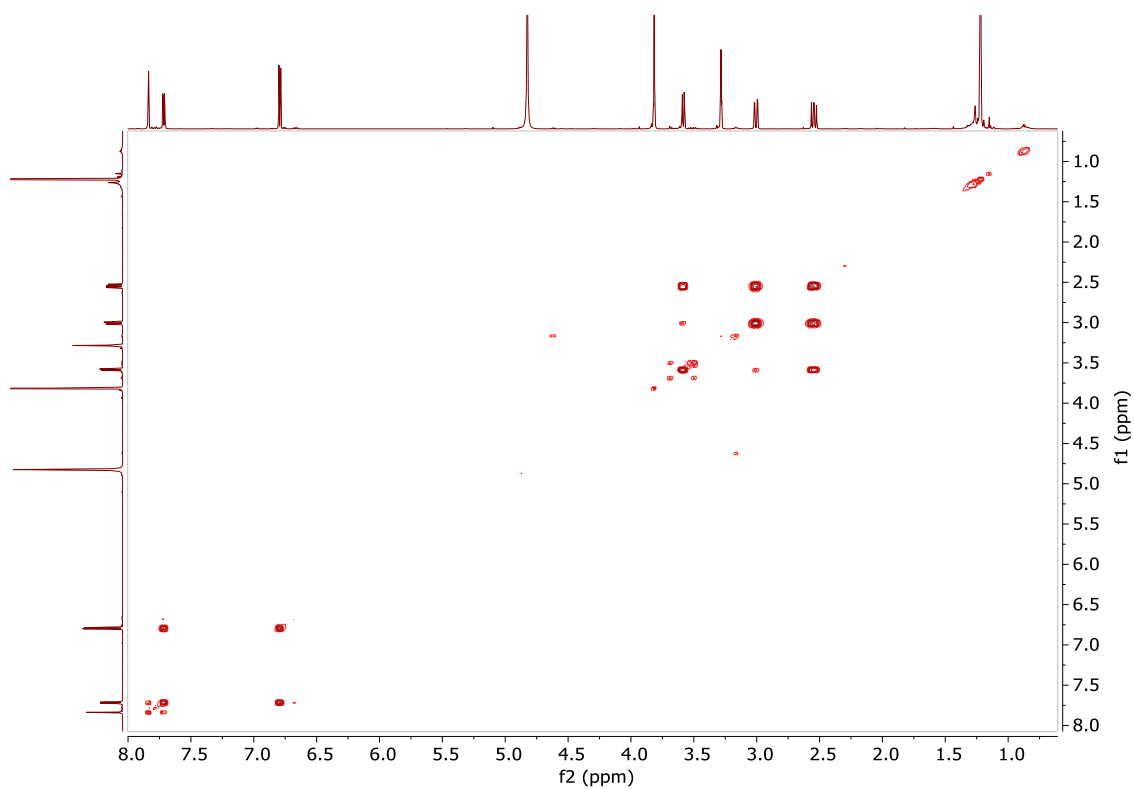


Figura 58. Espectro bidimensional COSY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **3**.

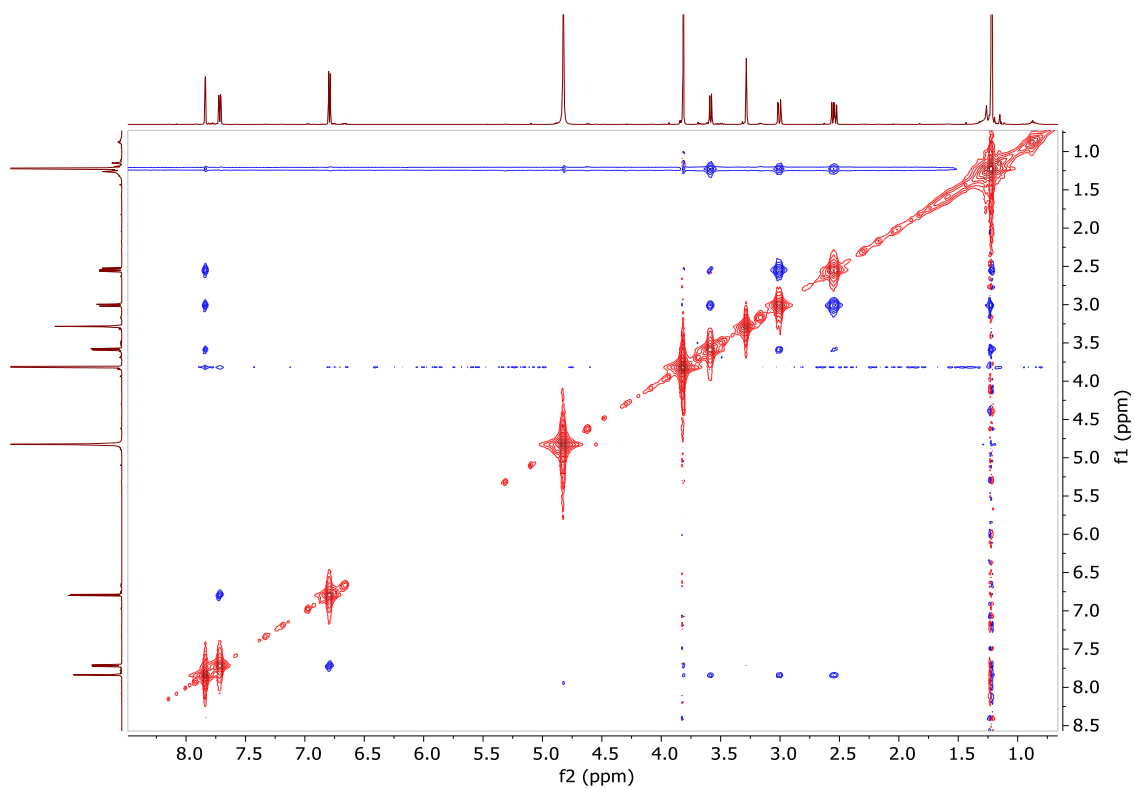


Figura 59. Espectro bidimensional NOESY ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) del derivado prenilado del ácido benzoico **3**.

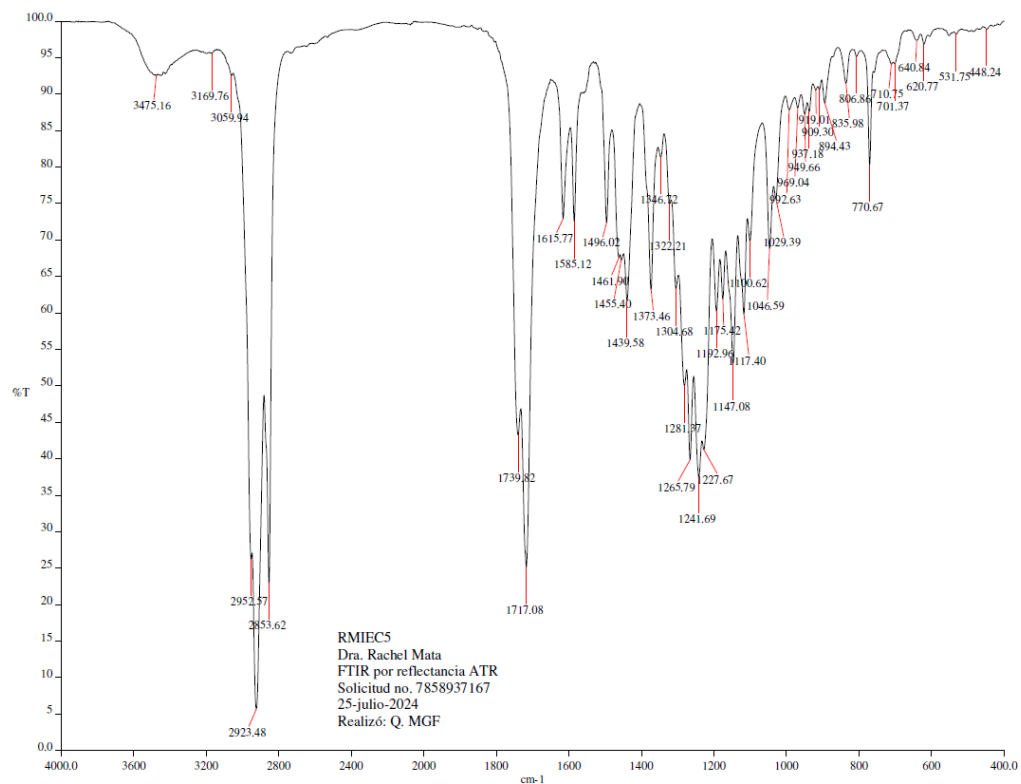


Figura 60. Espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) del compuesto 4.

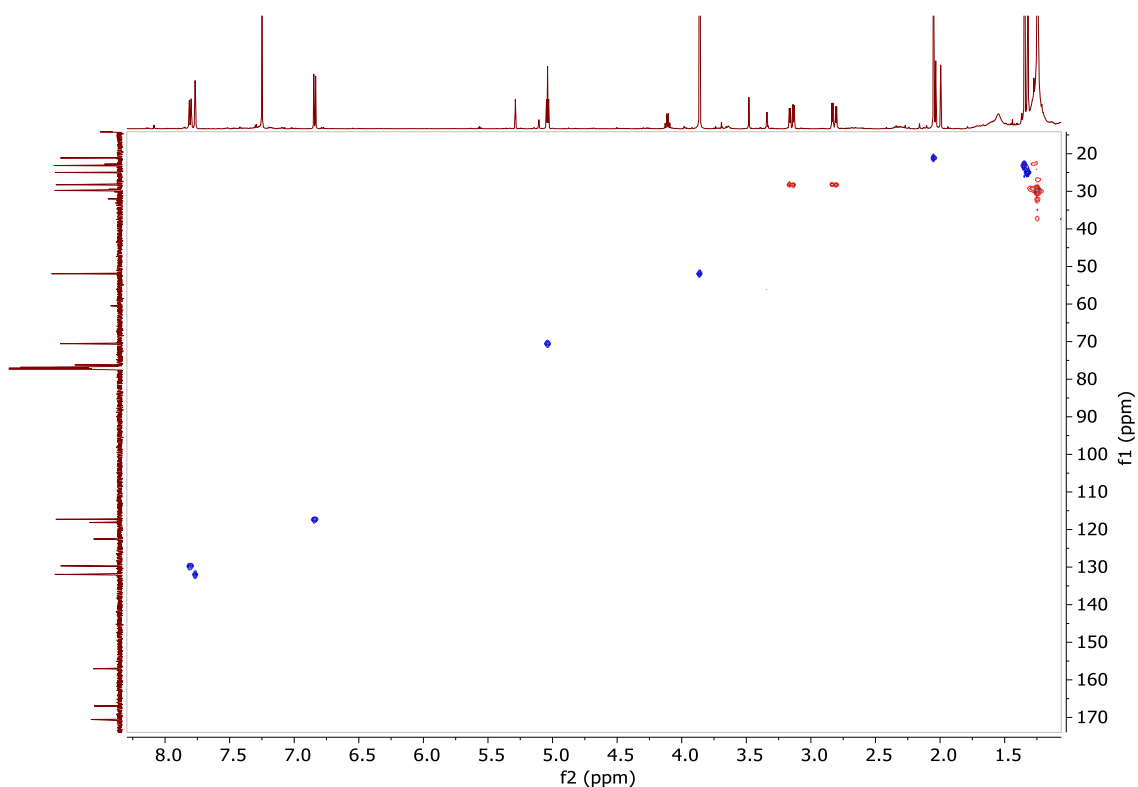


Figura 61. Espectro bidimensional HSQC (CDCl_3) del derivado prenilado del ácido benzoico 4.

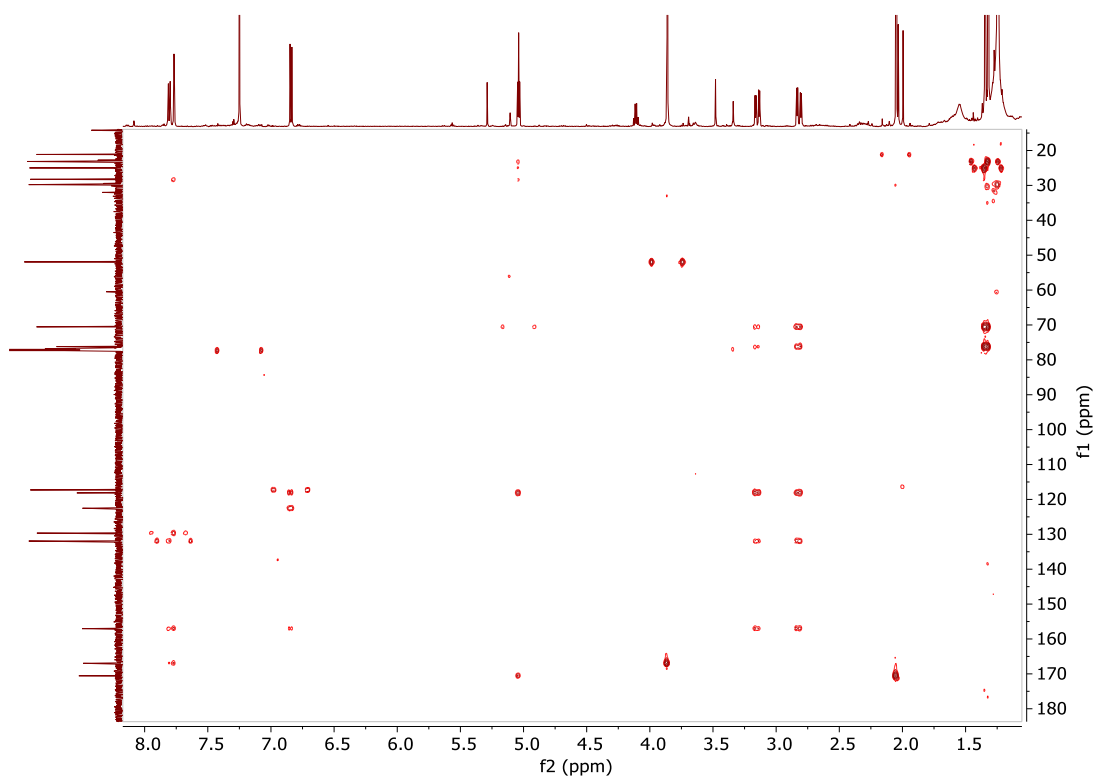


Figura 62. Espectro bidimensional HMBC (CDCl_3) del derivado prenilado del ácido benzoico **4**.

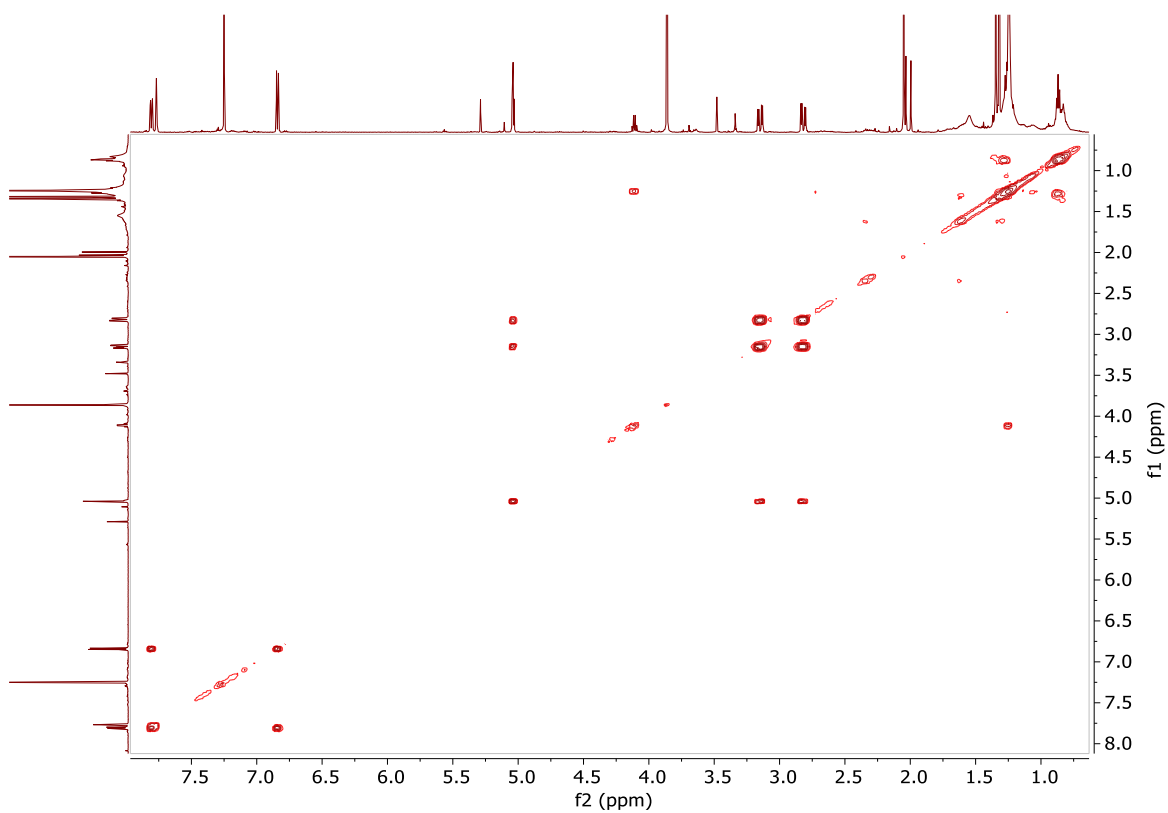


Figura 63. Espectro bidimensional COSY (CDCl_3) del derivado prenilado del ácido benzoico **4**.

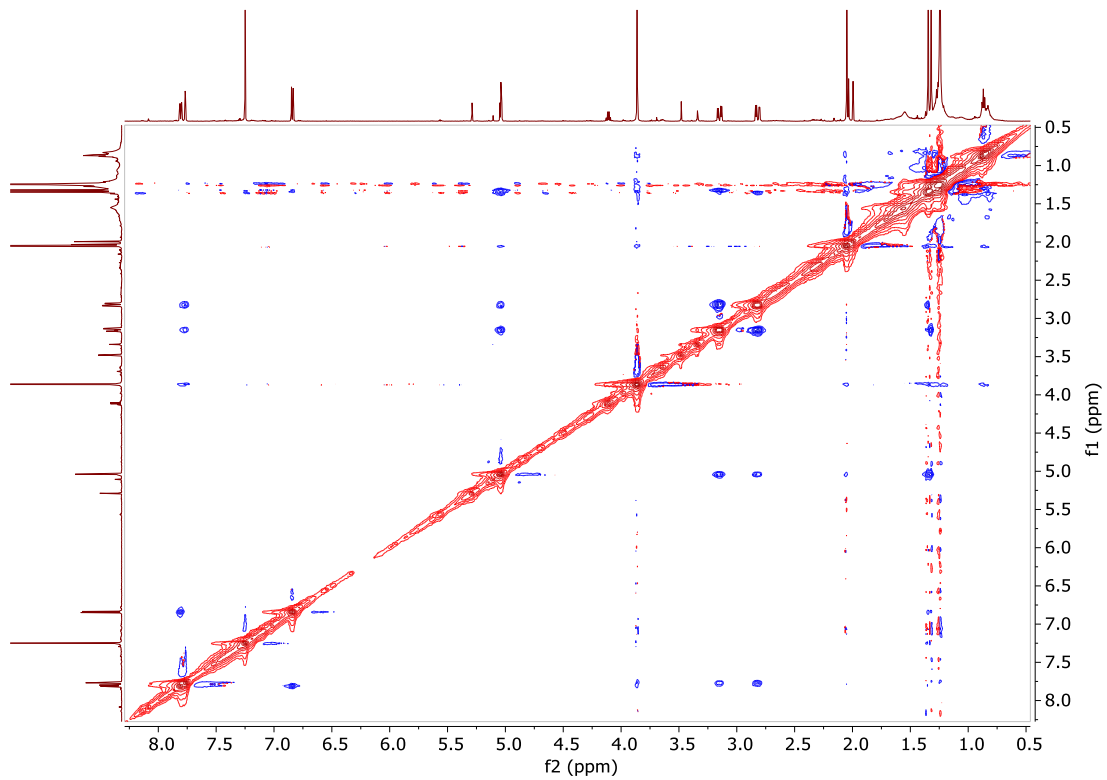


Figura 64. Espectro bidimensional NOESY (CDCl_3) del derivado prenilado del ácido benzoico **4**.

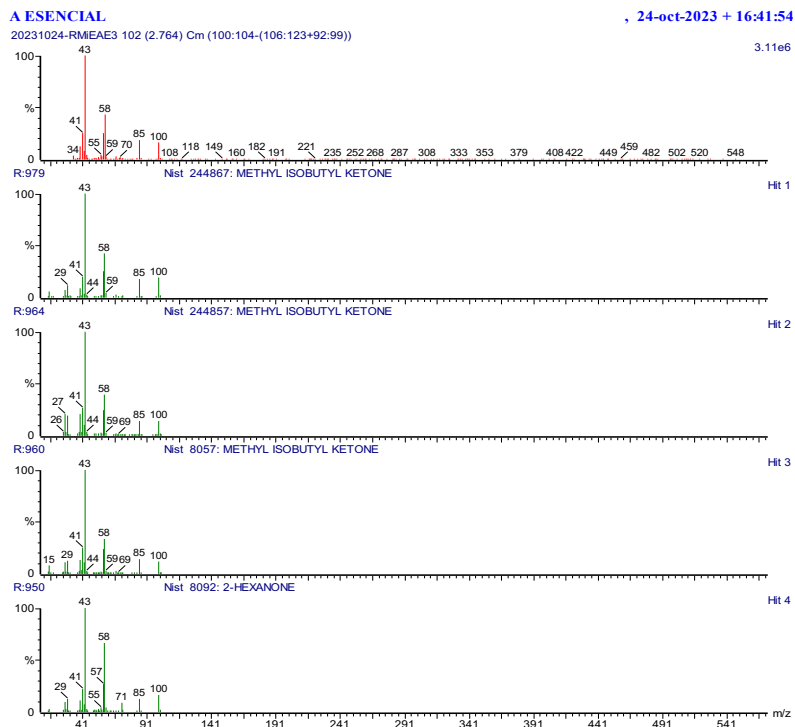


Figura 65. Espectro de masas del compuesto metil-isobutilcetona detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

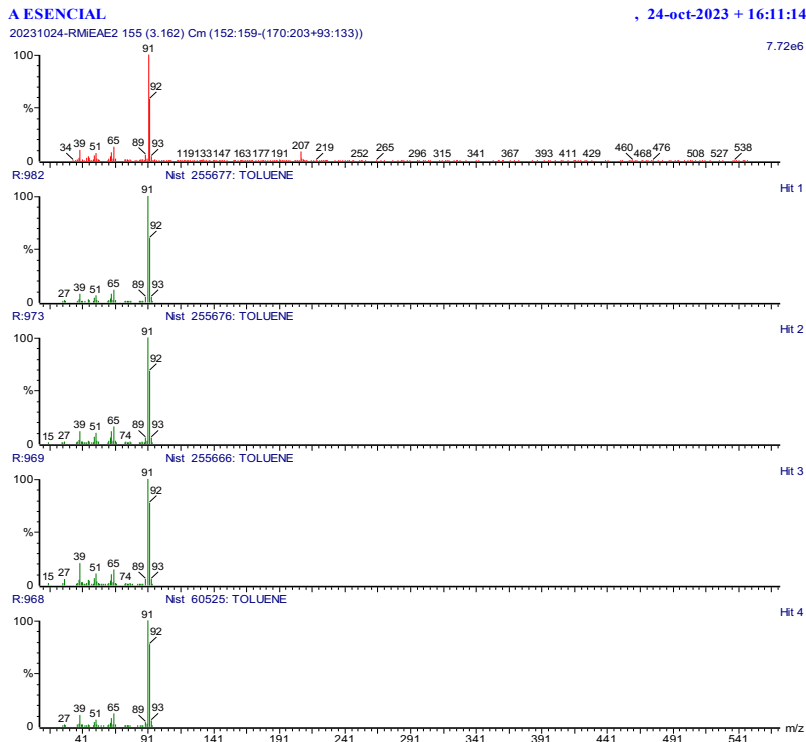


Figura 66. Especto de masas del compuesto tolueno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

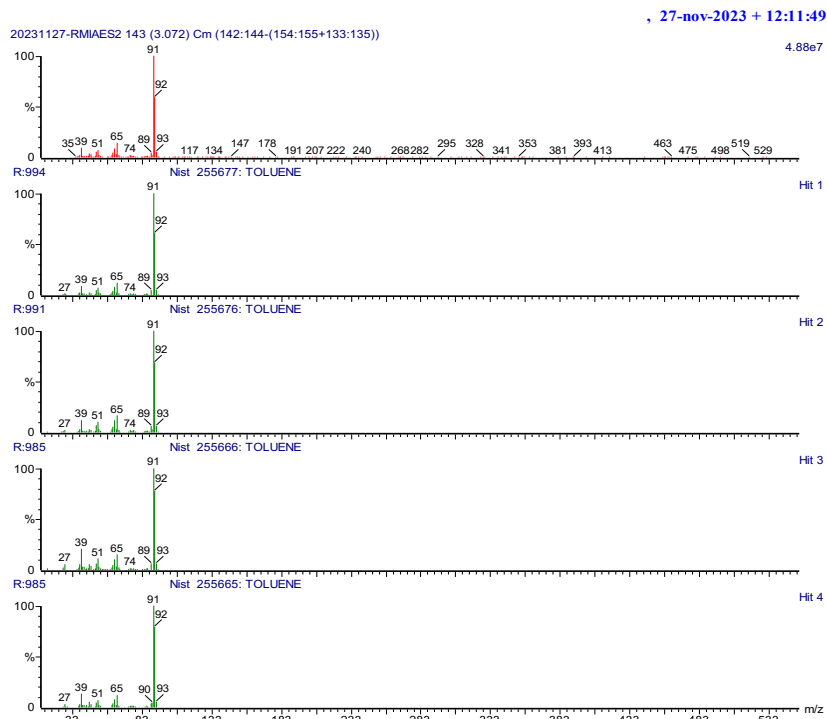


Figura 67. Especto de masas del compuesto tolueno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

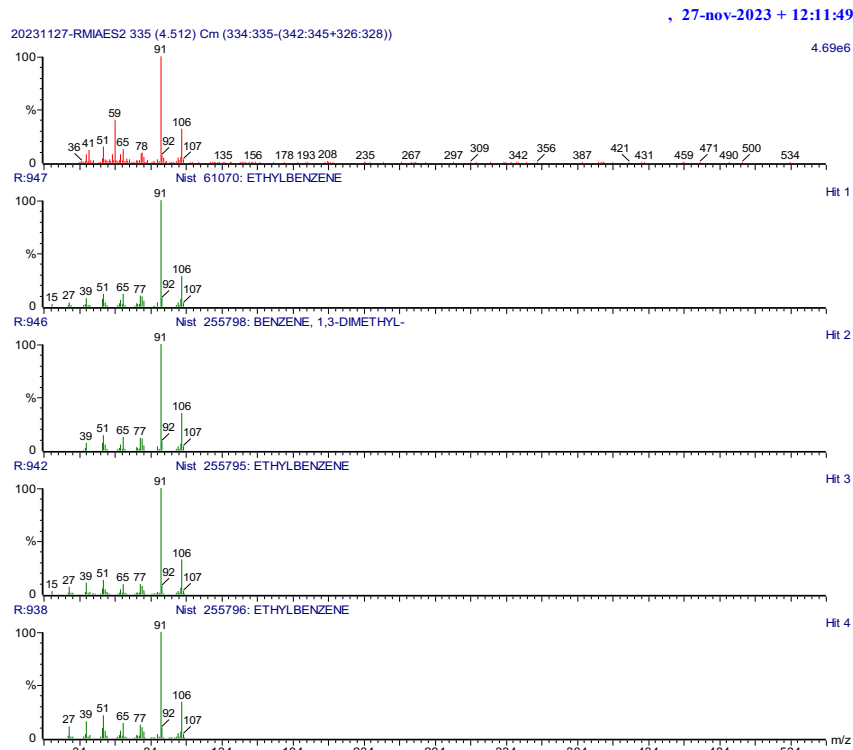


Figura 68. Especto de masas del compuesto etilbenceno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

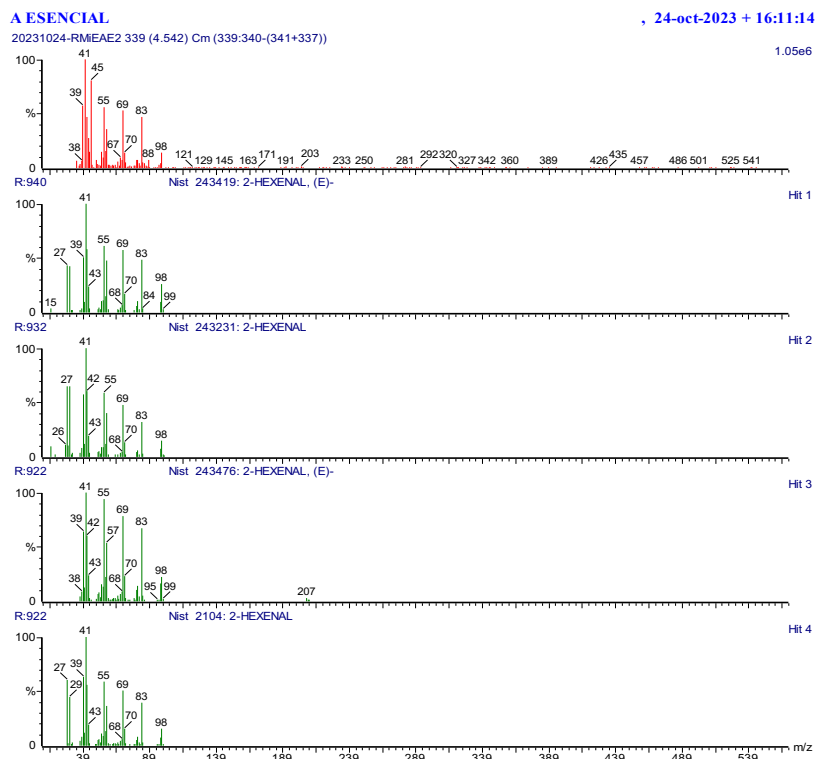


Figura 69. Especto de masas del compuesto (*E*)-2-hexenal detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

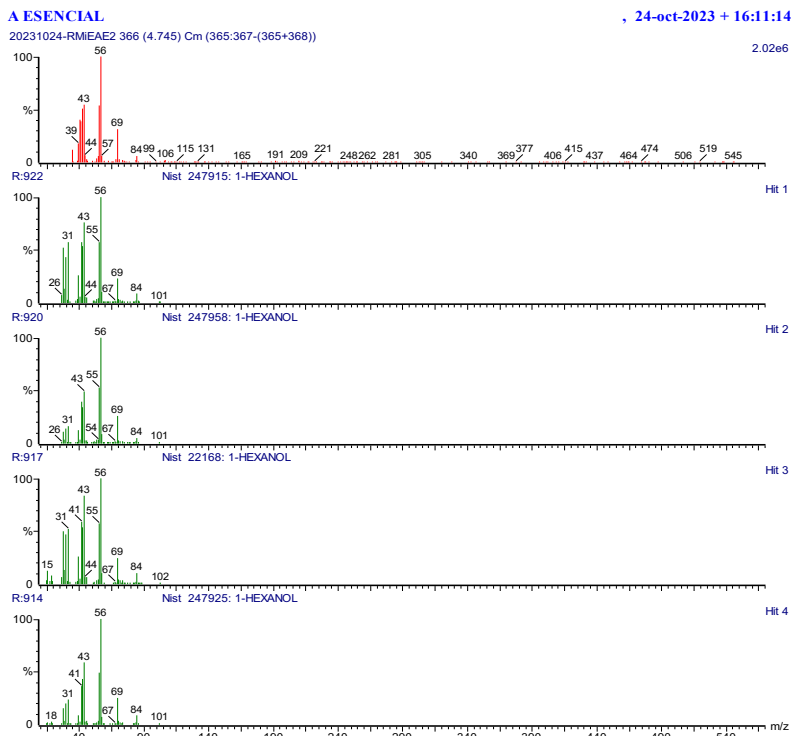


Figura 70. Especto de masas del compuesto hexanol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

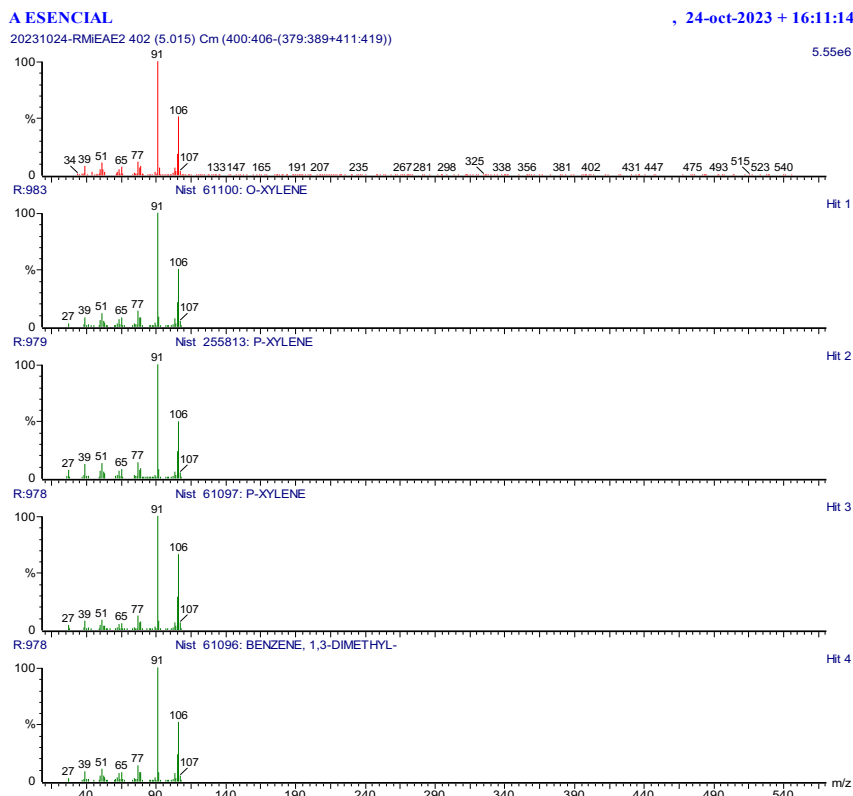


Figura 71. Especto de masas del compuesto *o*-xileno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

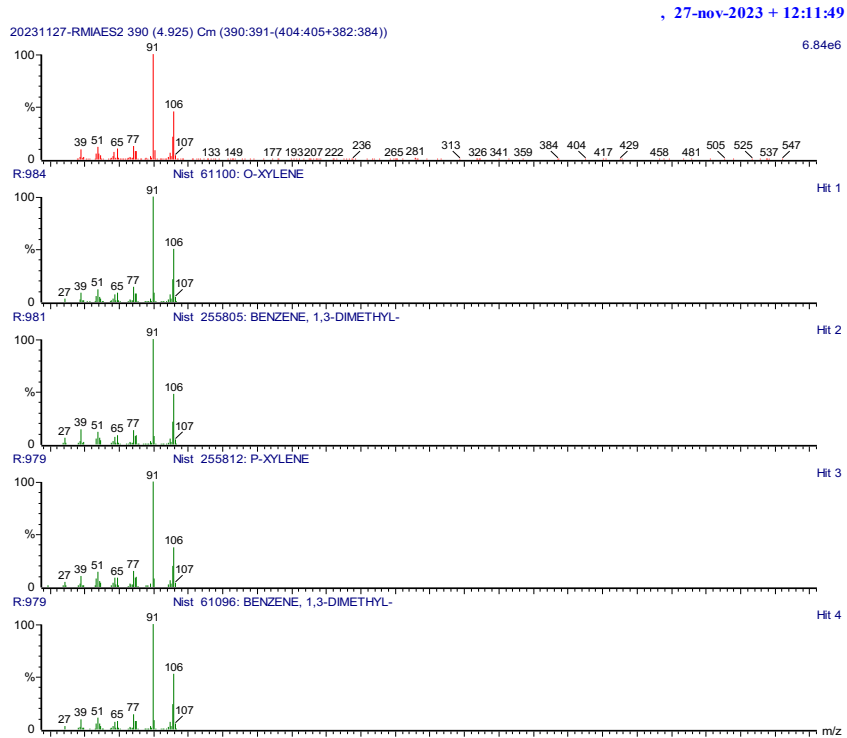


Figura 72. Especto de masas del compuesto *o*-xileno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

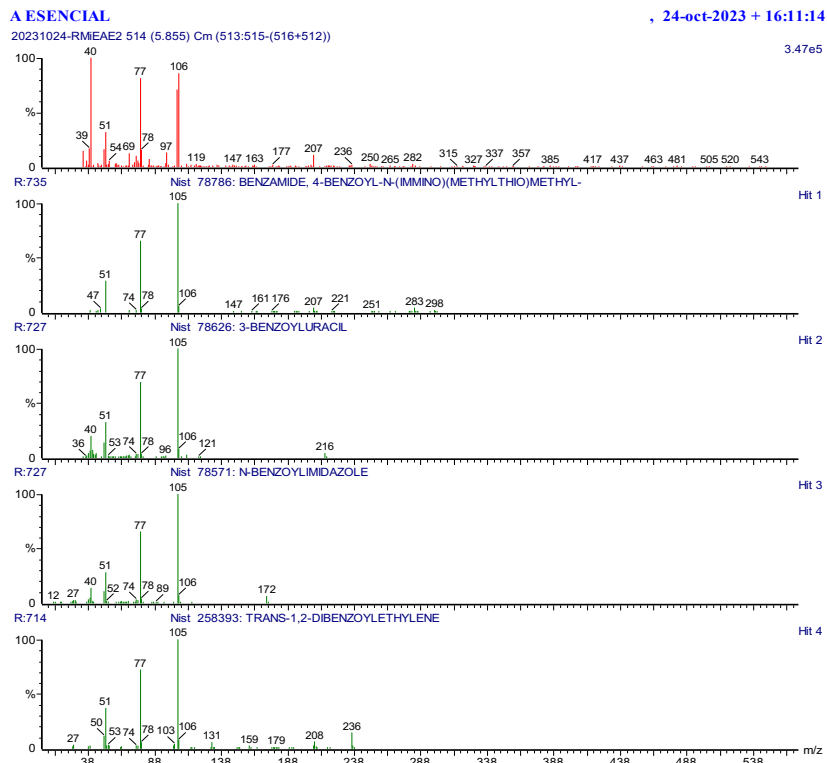


Figura 73. Especto de masas del compuesto benzaldehido detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

A ESENCIAL

20231024-RMIAE2 548 (6.110) Cm (547:550-(550+546))

, 24-oct-2023 + 16:11:14

9.07e5

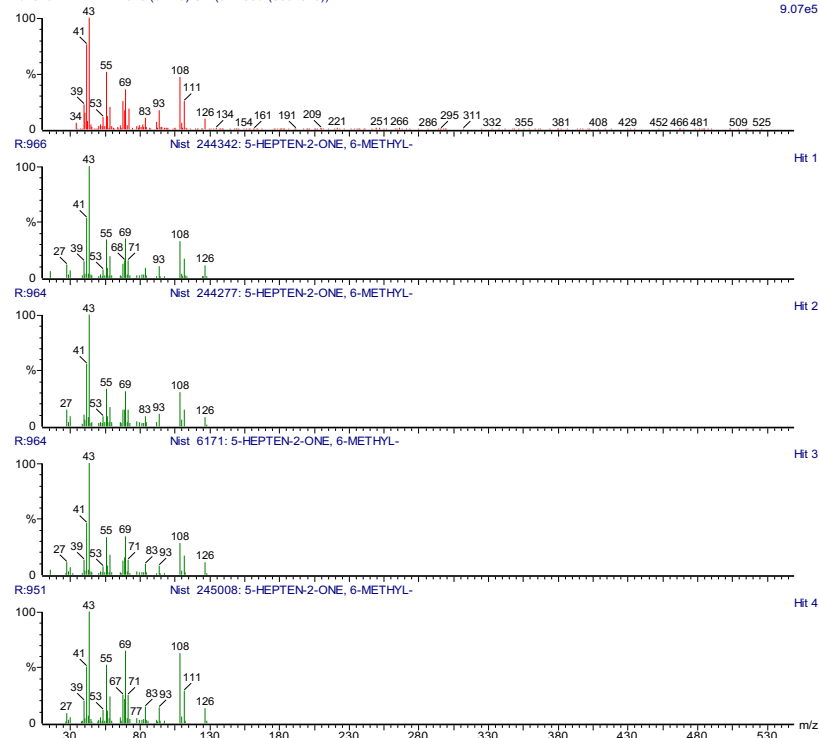


Figura 74. Especto de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ona detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

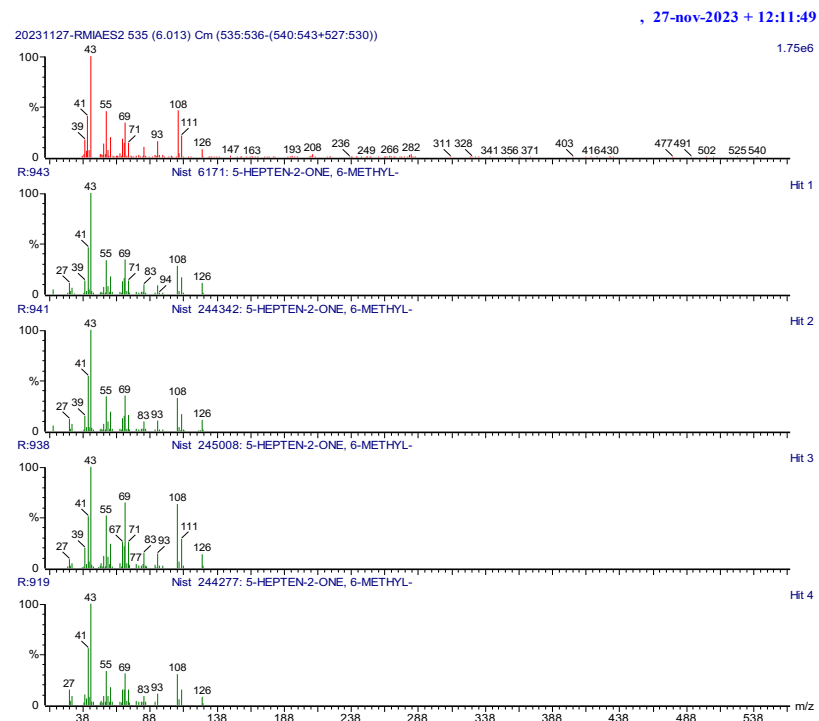


Figura 75. Especto de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ona detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

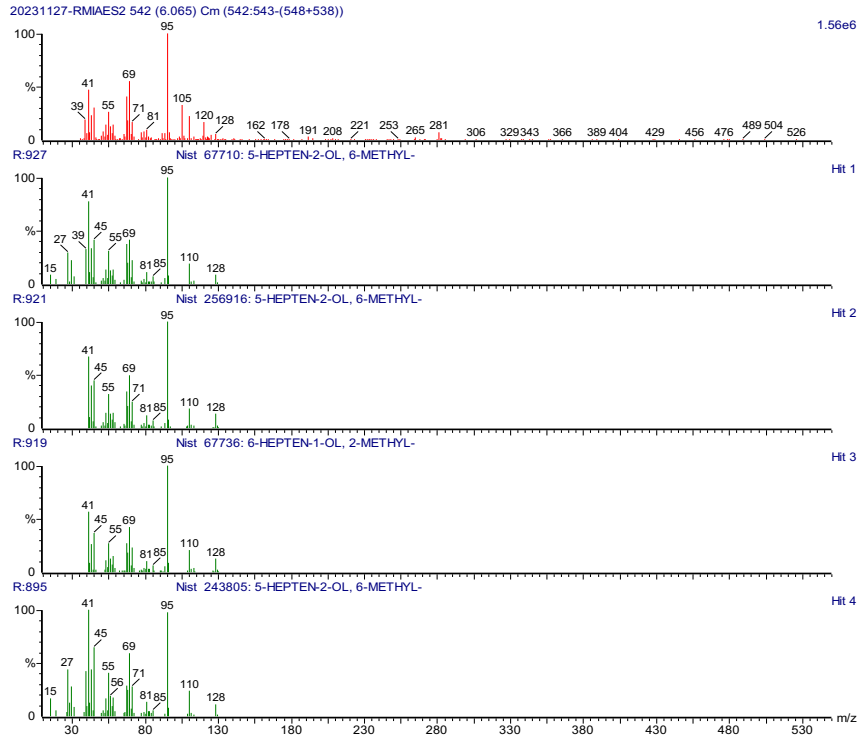


Figura 76. Espectro de masas del compuesto 6-metil-5-hepten-2-ol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

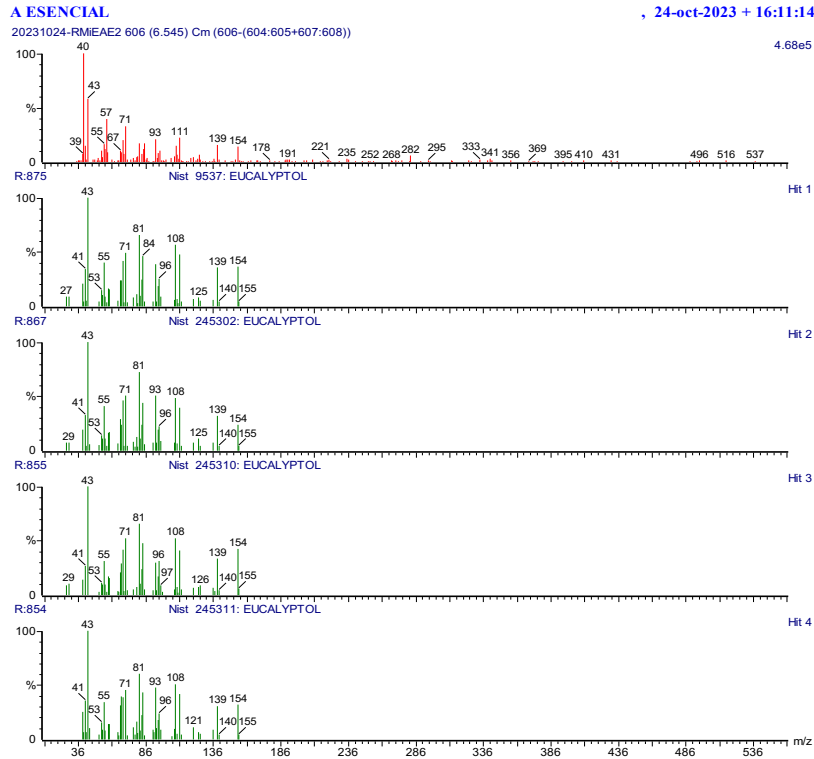


Figura 77. Espectro de masas del compuesto eucalyptol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

A ESENCIAL

, 24-oct-2023 + 16:11:14

20231024-RMEAE2 612 (6.590) Cm (612:613-(613:614+610:611))

5.74e5

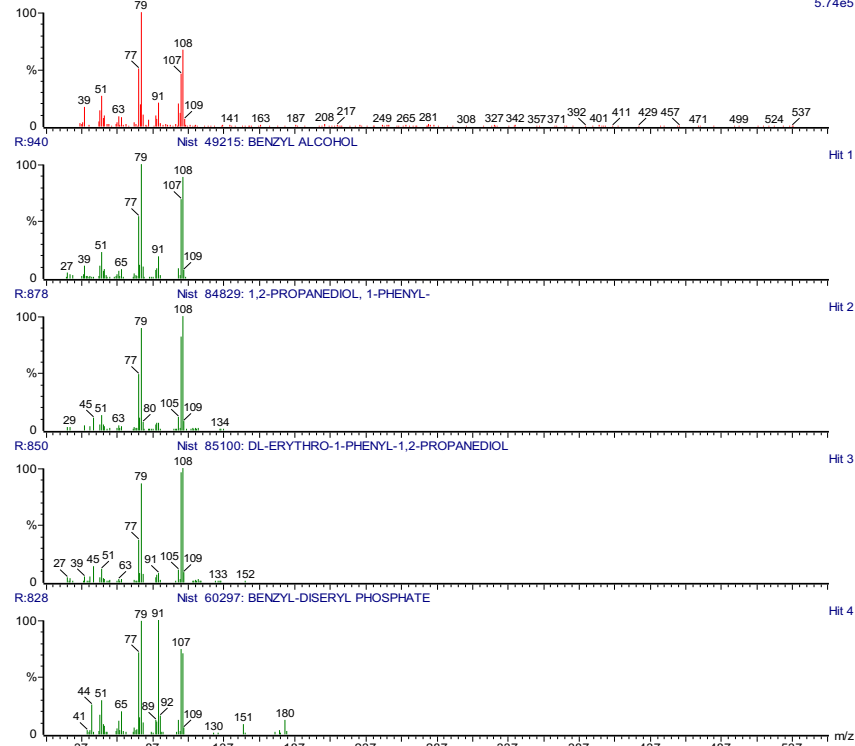


Figura 78. Especto de masas del compuesto alcohol bencílico detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

, 27-nov-2023 + 11:29:54

20231127-RMAES1 599 (6.493) Cm (598:601-(610:615+589:593))

2.95e6

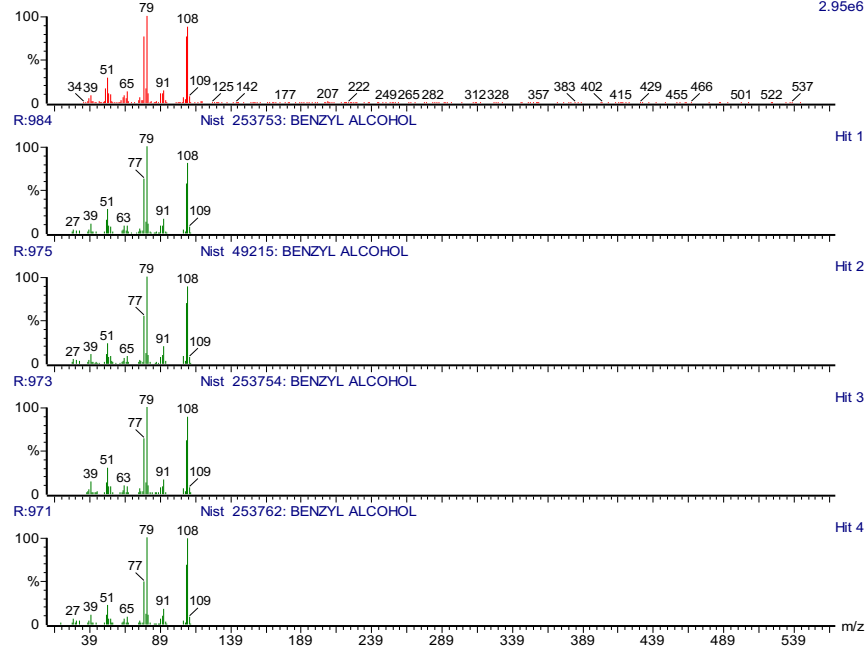


Figura 79. Especto de masas del compuesto alcohol bencílico detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

A ESENCIAL

, 24-oct-2023 + 16:11:14

20231024-RMIEAE2 624 (6.680) Cm (622:625-(627+618:621))

2.78e6



Figura 80. Espectro de masas del compuesto fenilacetaldehído detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

, 27-nov-2023 + 11:29:54

20231127-RMIAES1 611 (6.583) Cm (611:612-(616:617+605))

3.00e6

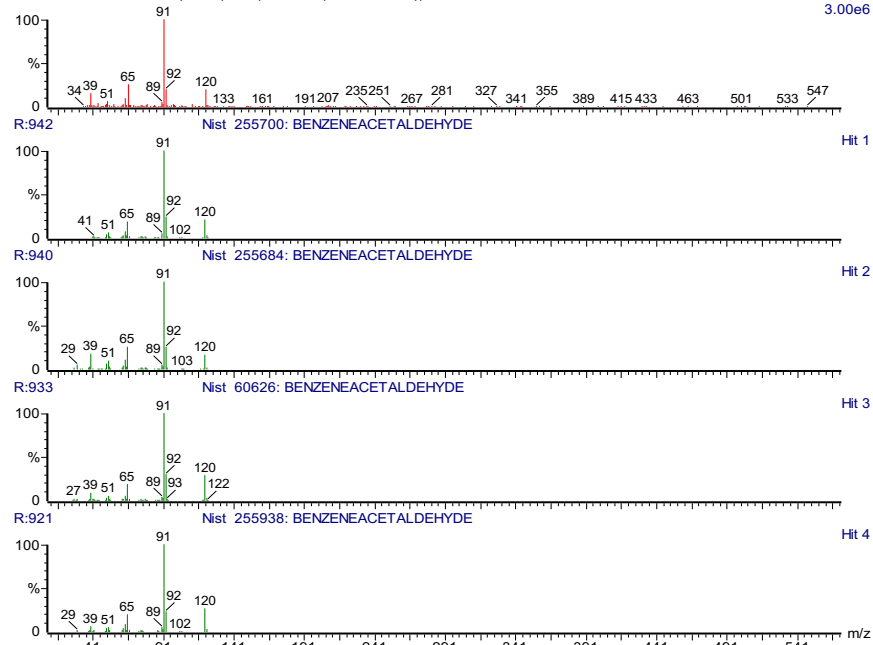


Figura 81. Espectro de masas del compuesto fenilacetaldehído detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

A ESENCIAL

, 24-oct-2023 + 16:41:54

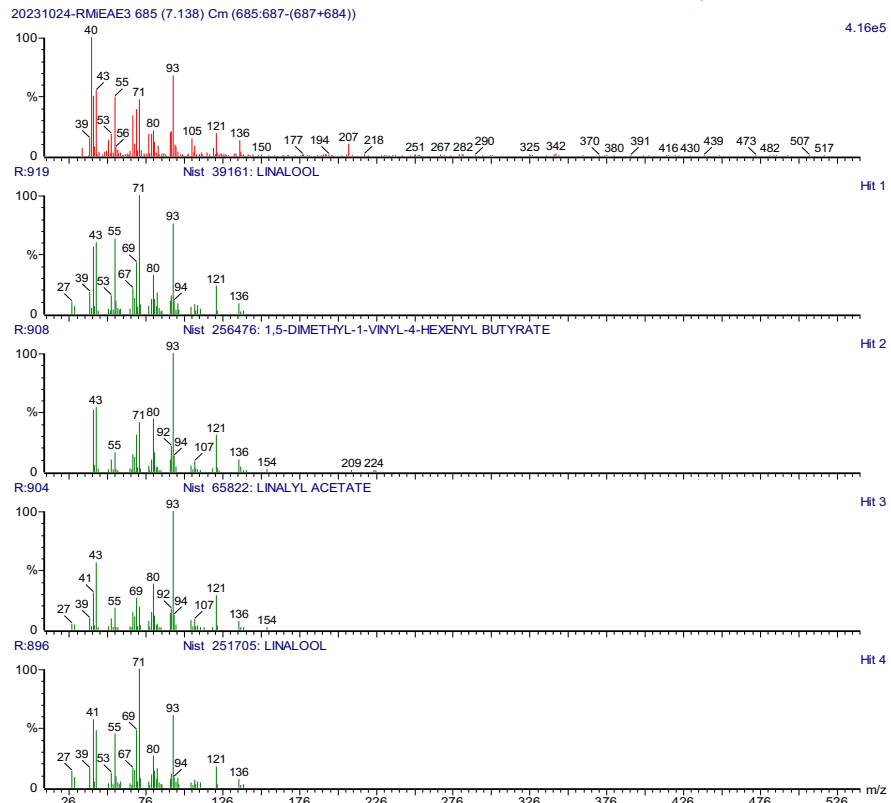


Figura 82. Espectro de masas del compuesto linalol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

, 27-nov-2023 + 11:29:54

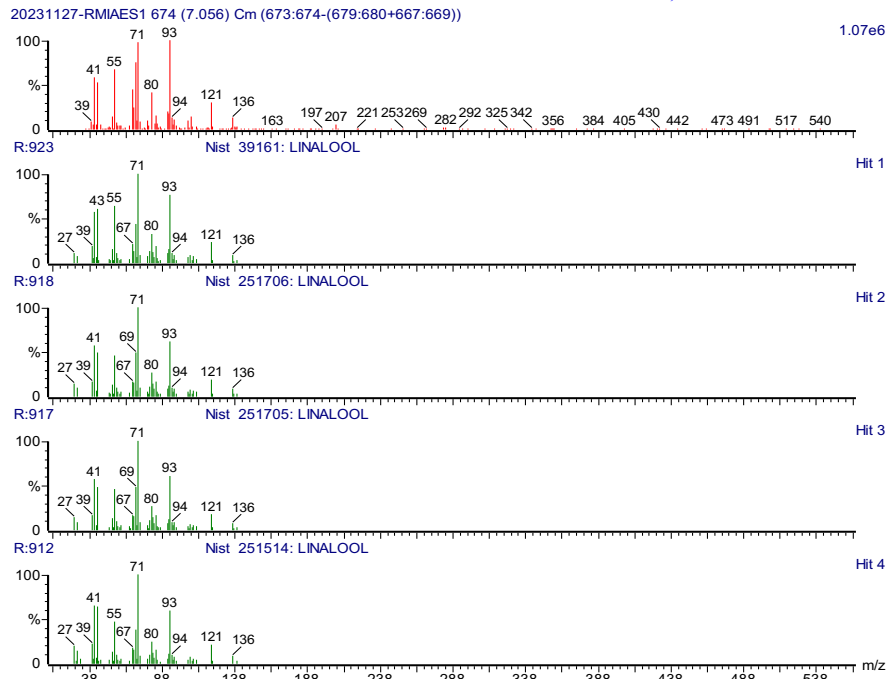


Figura 83. Espectro de masas del compuesto linalol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

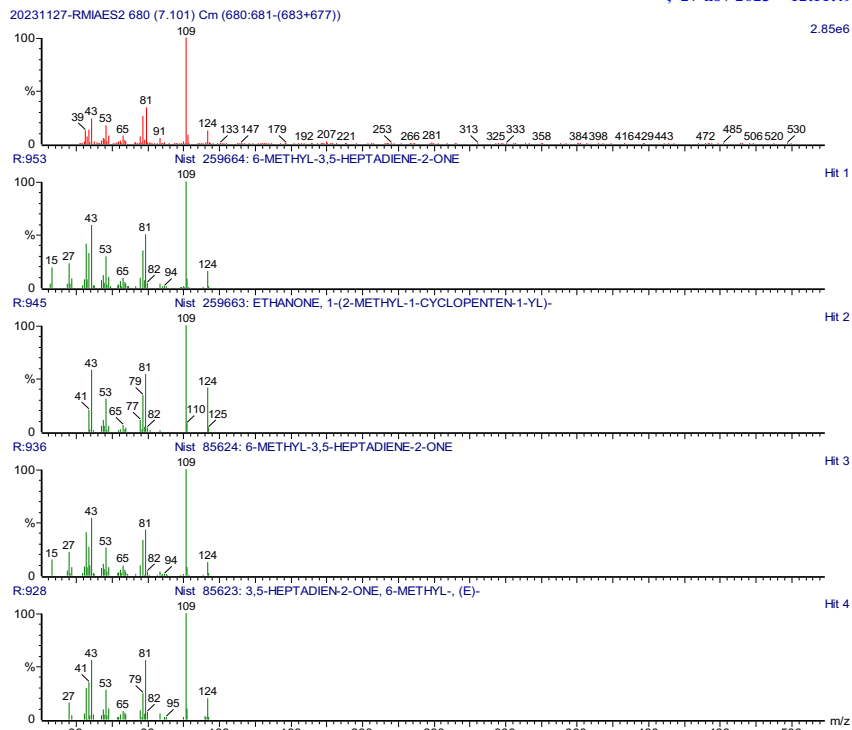


Figura 84. Especto de masas del compuesto 6-metil-3,5-heptadien-2-ona detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

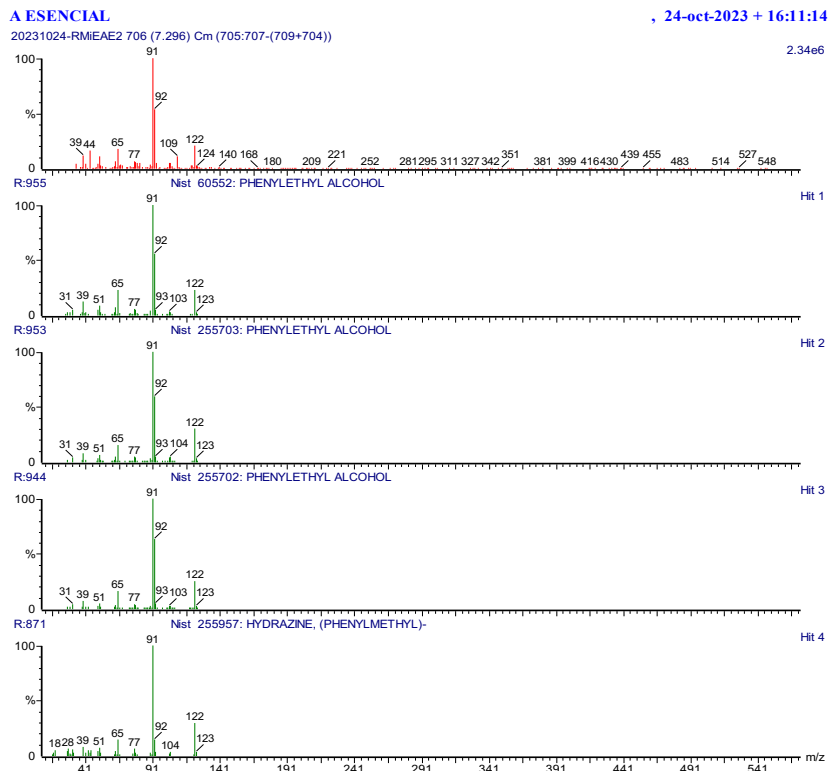


Figura 85. Especto de masas del compuesto alcohol fenético detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

, 27-nov-2023 + 11:29:54

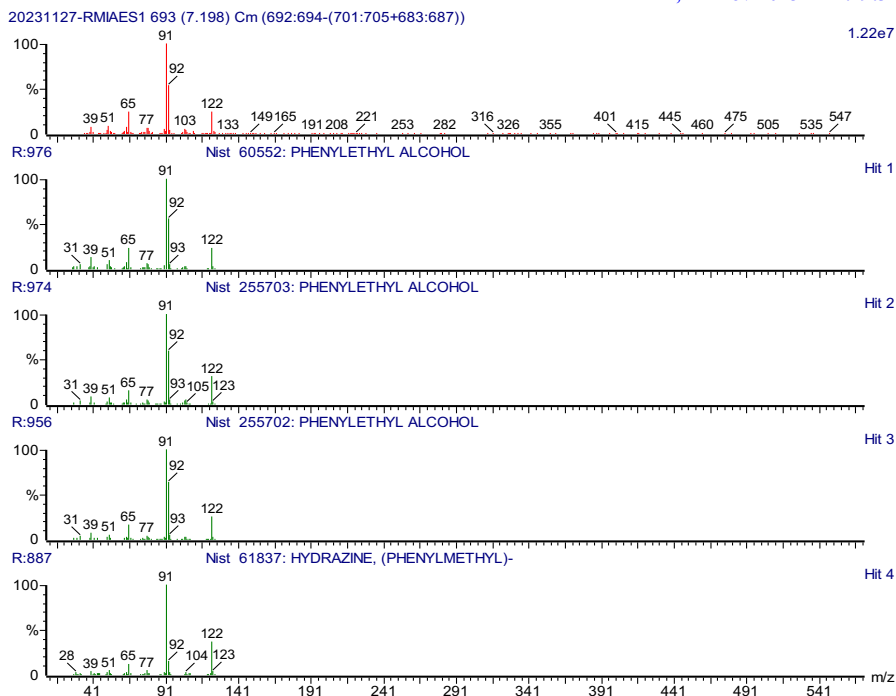


Figura 86. Espectro de masas del compuesto alcohol fenilico detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

, 24-oct-2023 + 16:11:14

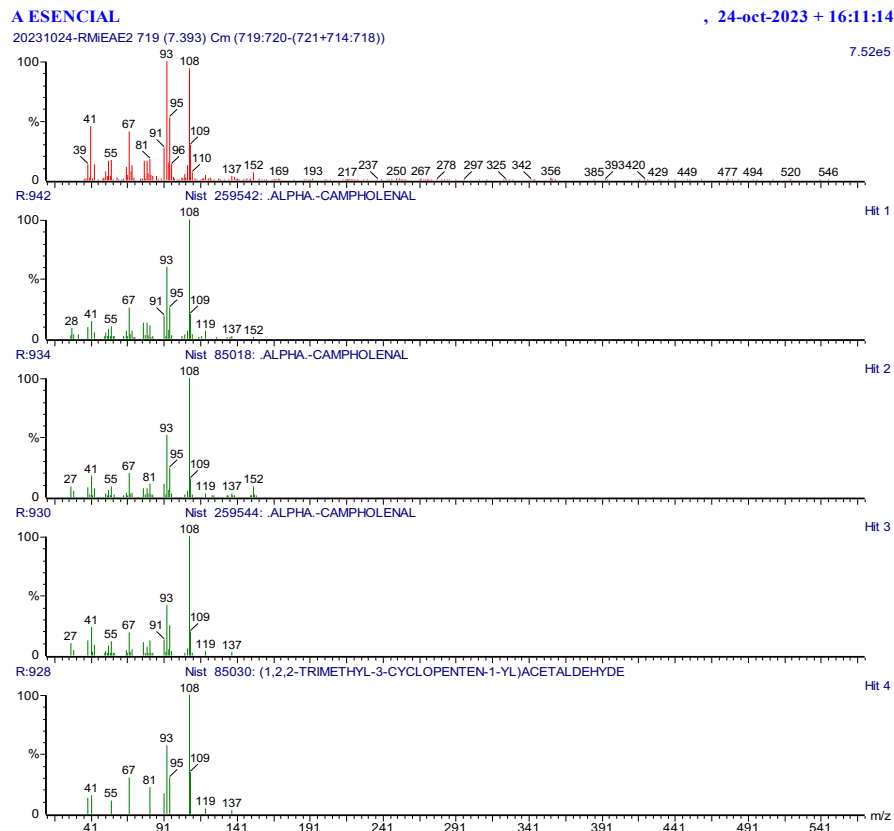


Figura 87. Espectro de masas del compuesto α -camfolenal detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

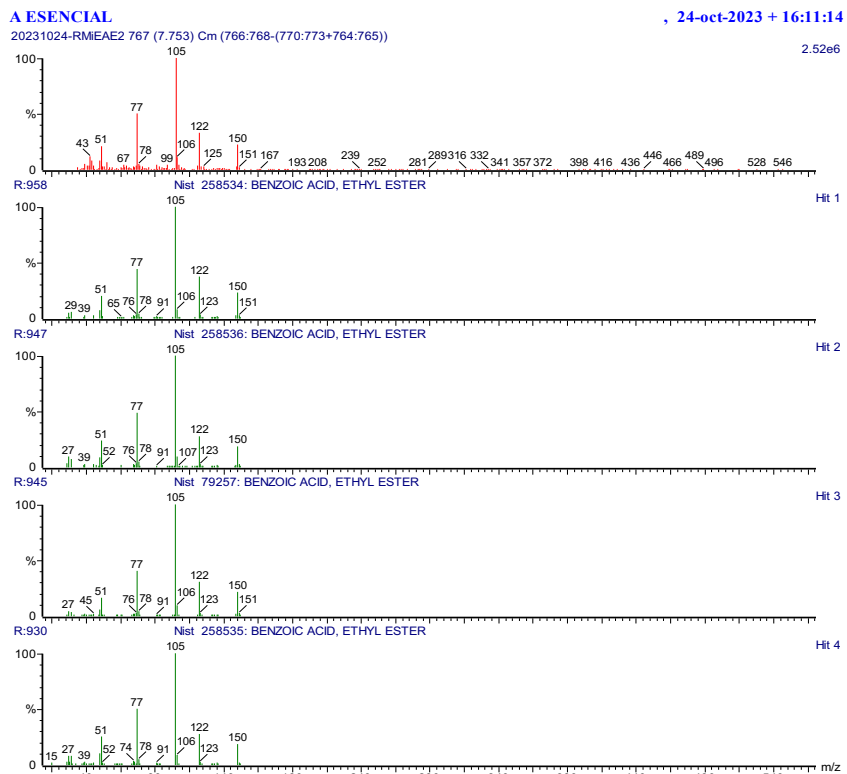


Figura 88. Especto de masas del compuesto benzoato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

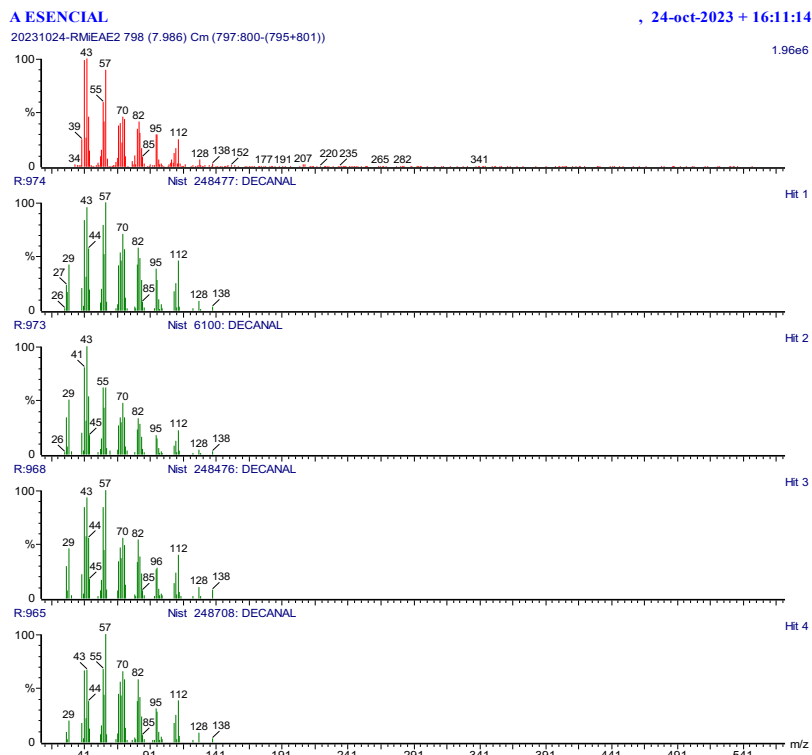


Figura 89. Especto de masas del compuesto decanal detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

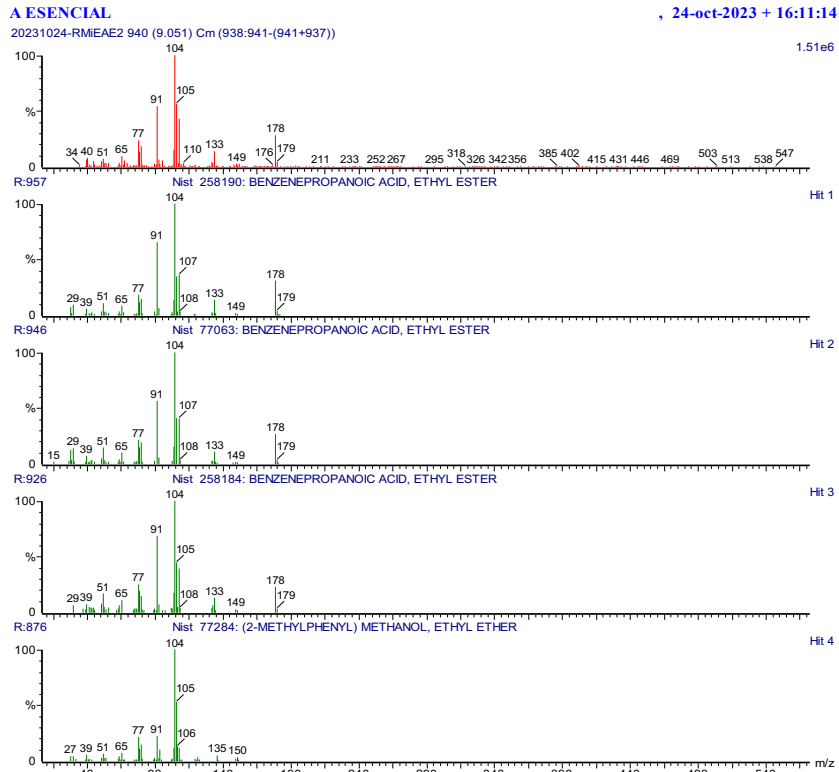


Figura 90. Especto de masas del compuesto dihidrocinamato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

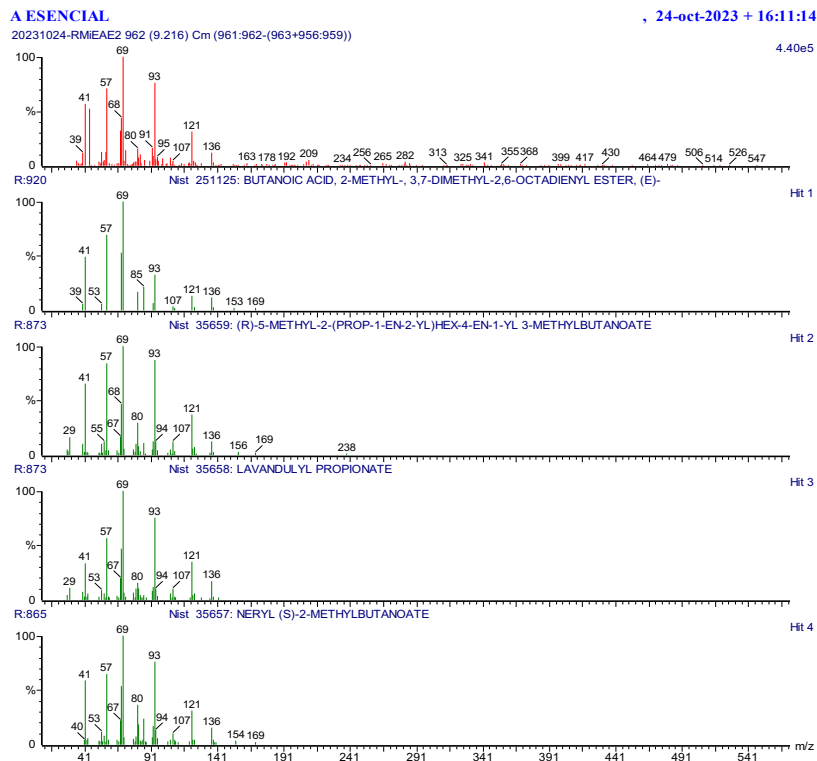


Figura 91. Especto de masas del compuesto propionato de lavandulilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

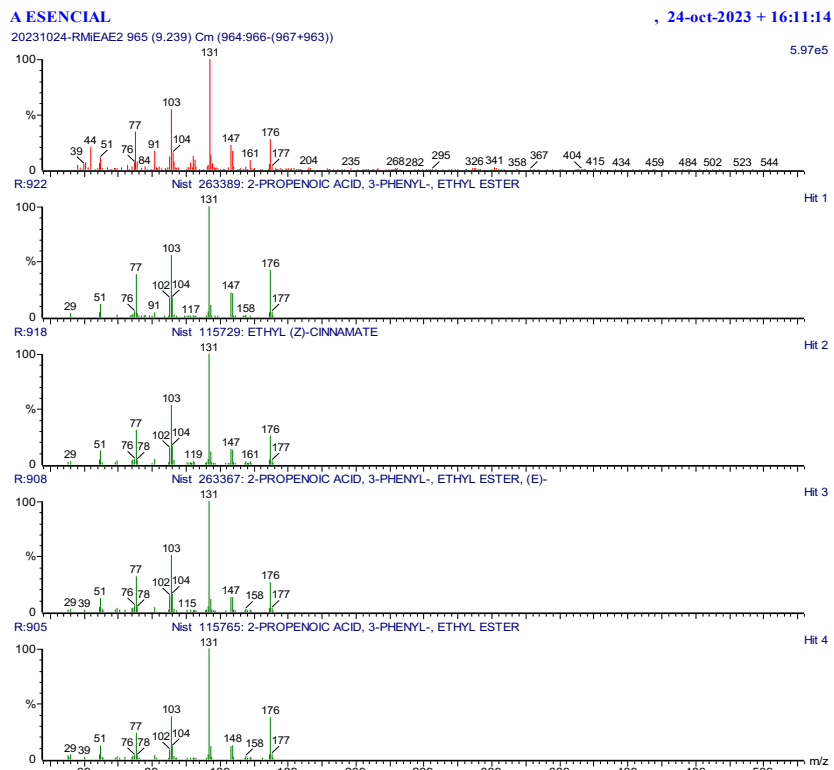


Figura 92. Espectro de masas del compuesto (Z)-ácido cinámico, etil ester detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

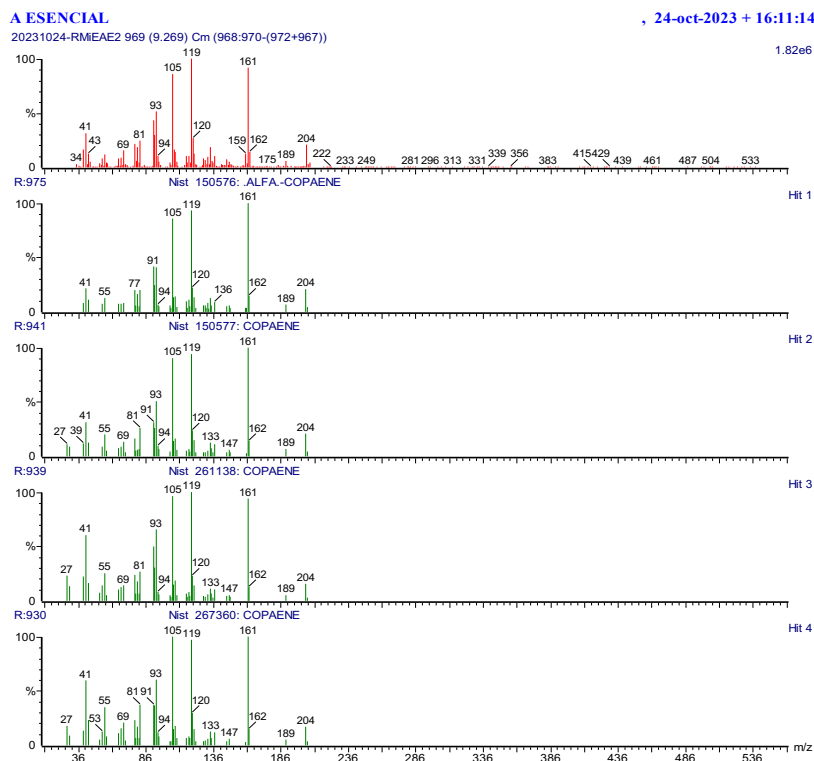


Figura 93. Espectro de masas del compuesto α -copaeno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

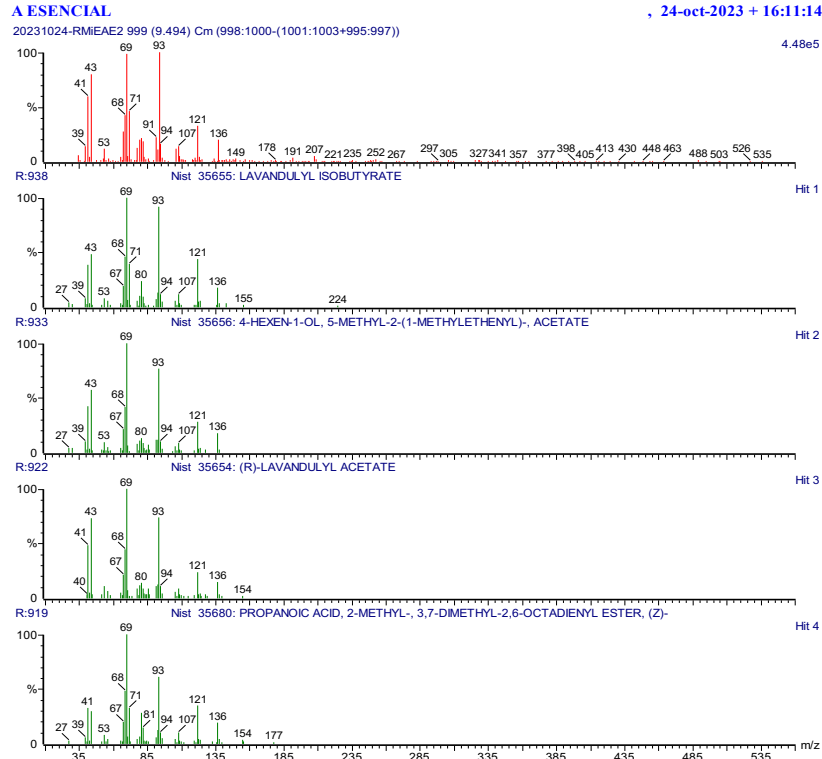


Figura 94. Especto de masas del compuesto isobutirato de lavandulilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

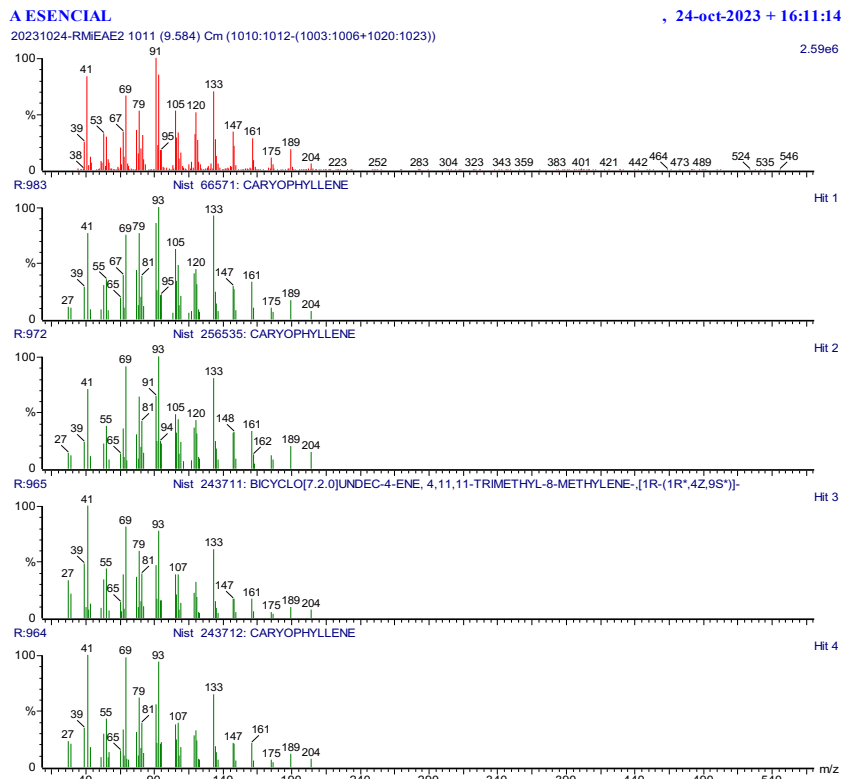


Figura 95. Especto de masas del compuesto β -cariofileno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

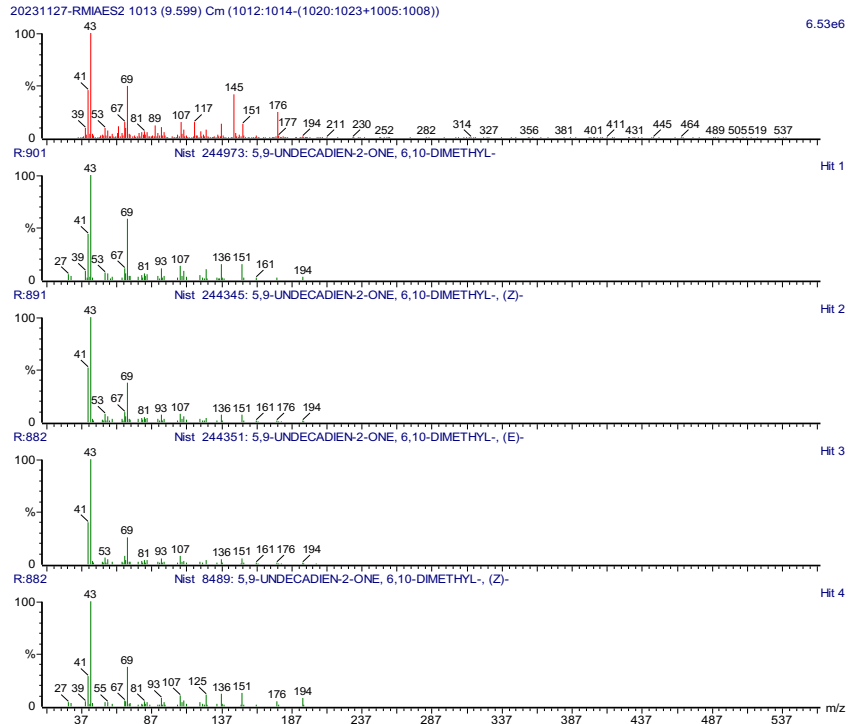


Figura 96. Espectro de masas del compuesto geranyl-acetona detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

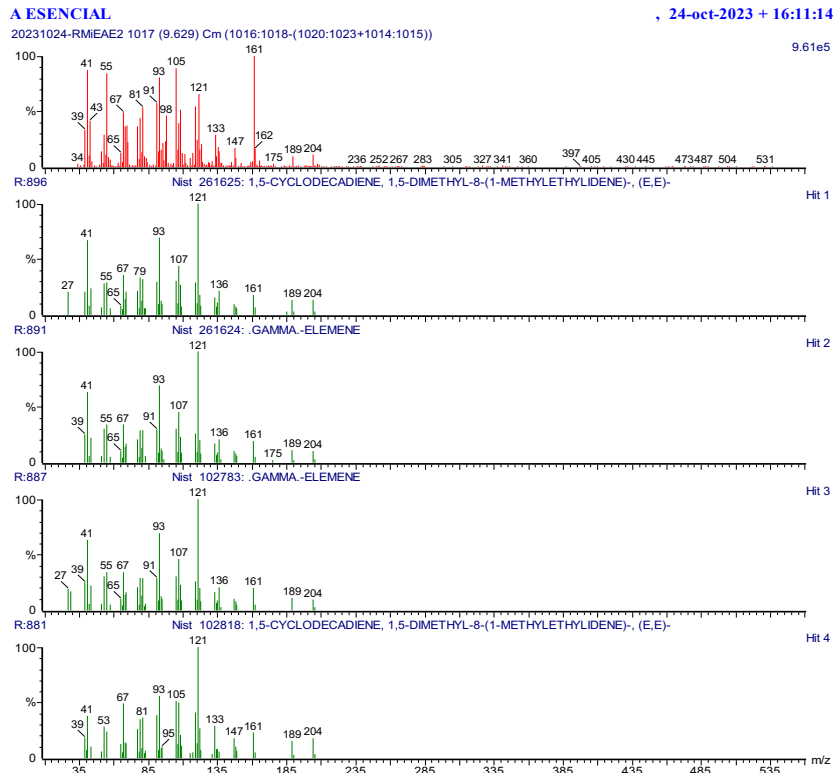


Figura 97. Espectro de masas del compuesto γ -elemeno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

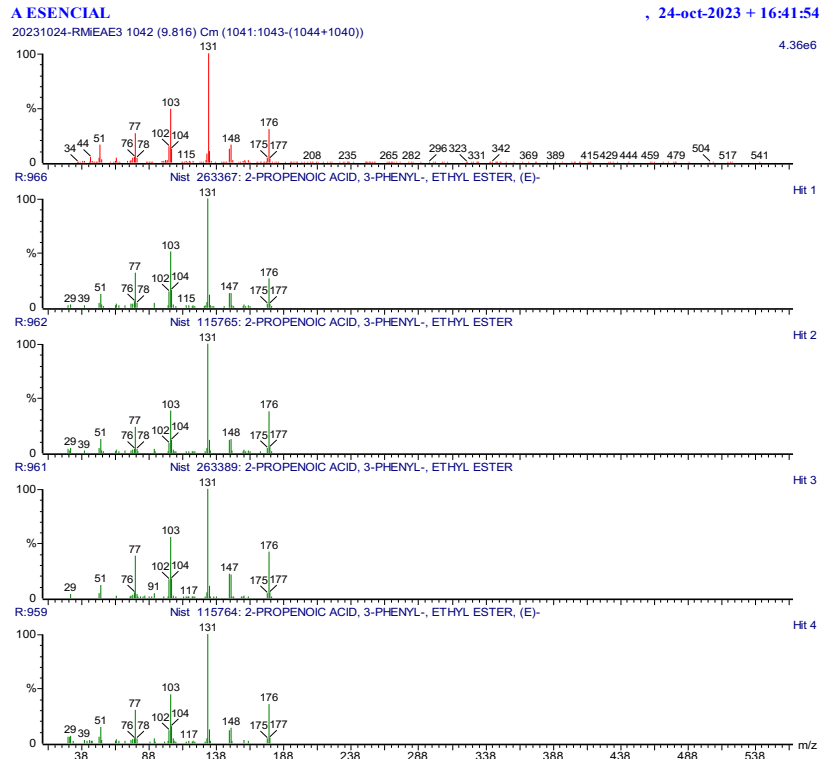


Figura 98. Espectro de masas del compuesto cinamato de etilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

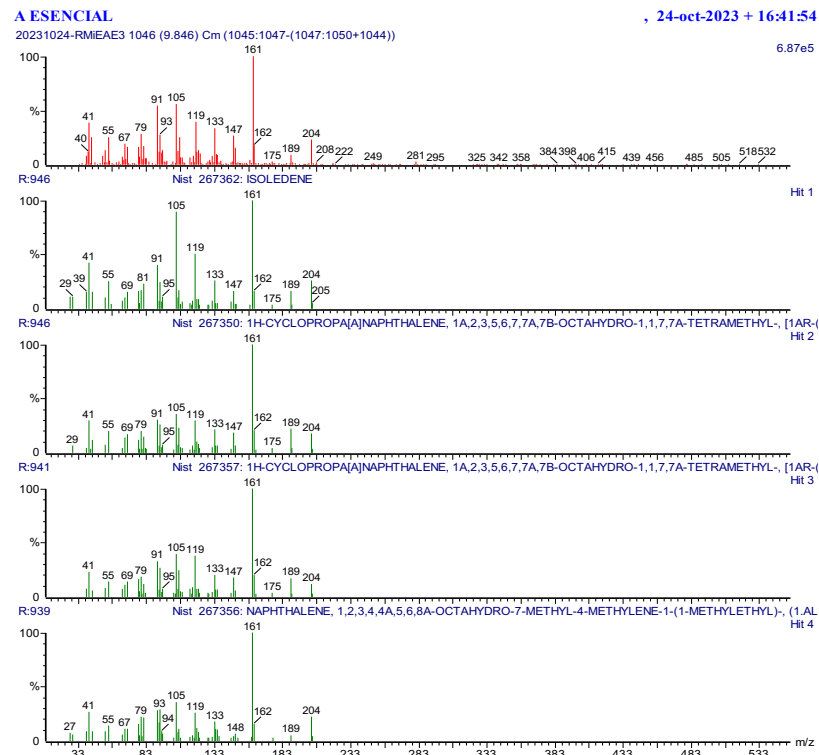


Figura 99. Espectro de masas del compuesto α -selineno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

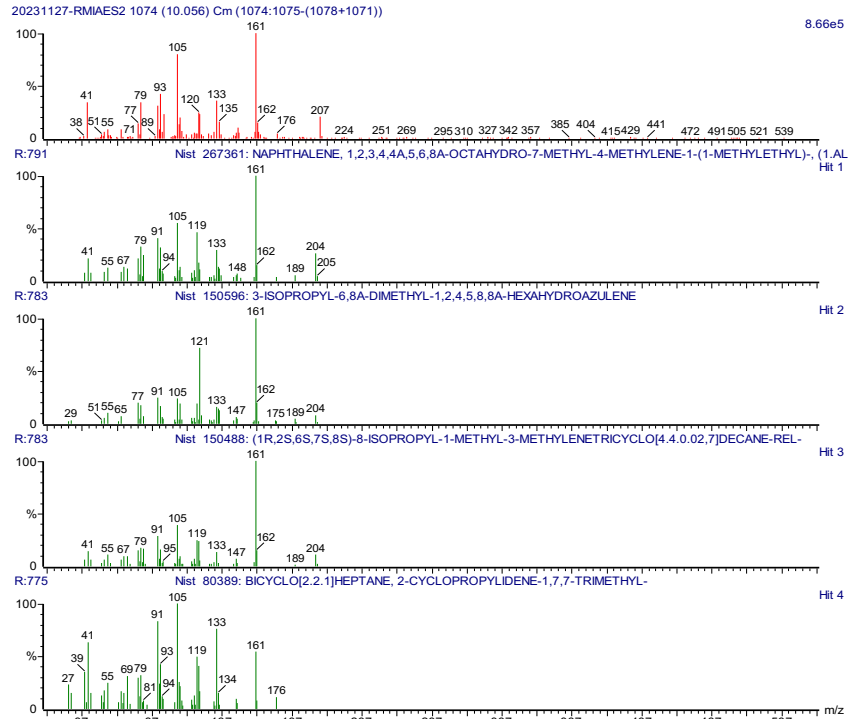


Figura 100. Espectro de masas del compuesto γ -cadineno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

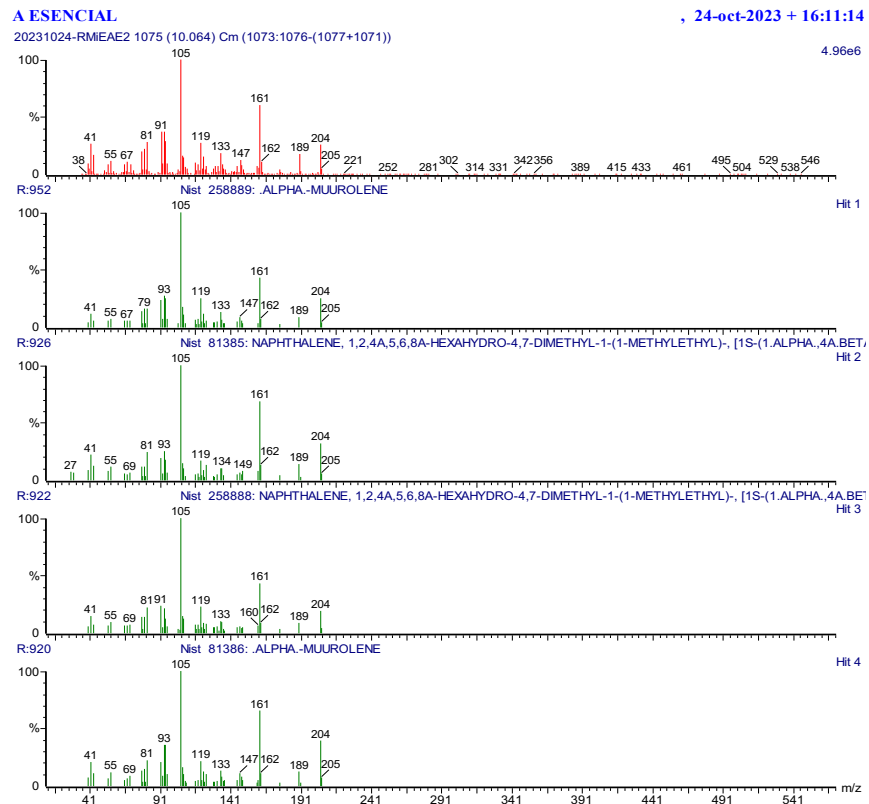


Figura 101. Espectro de masas del compuesto α -muuroleno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

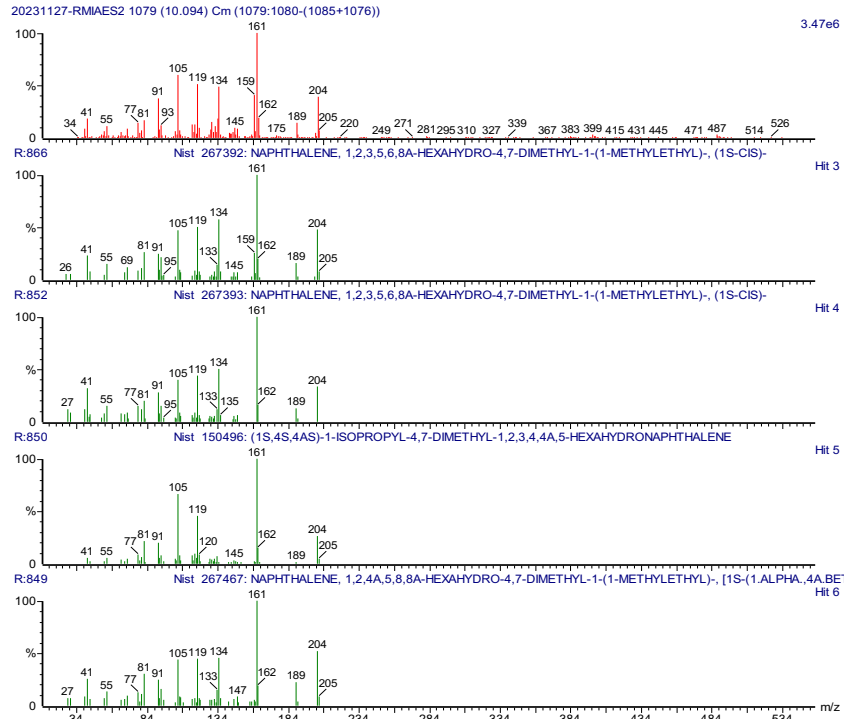


Figura 102. Espectro de masas del compuesto δ -cadineno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

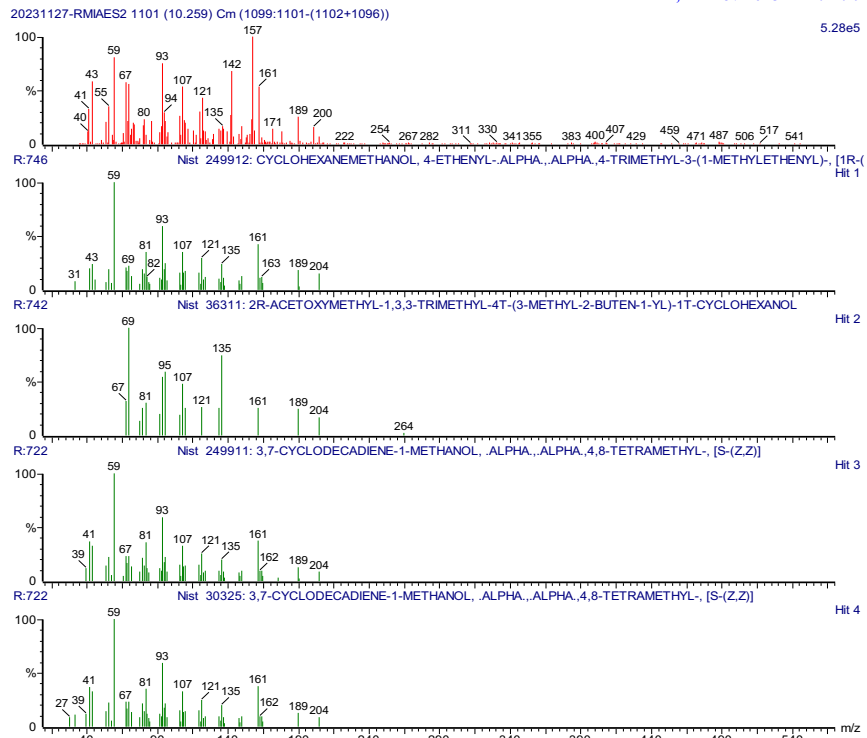


Figura 103. Espectro de masas del compuesto 10-*epi*-elemol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

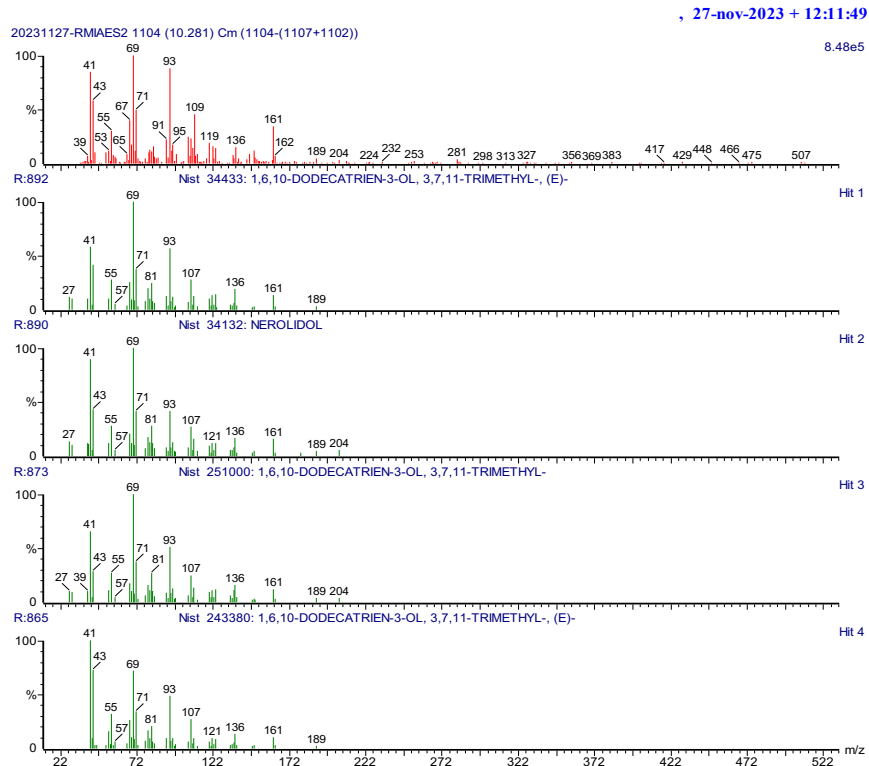


Figura 104. Espectro de masas del compuesto nerolidol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

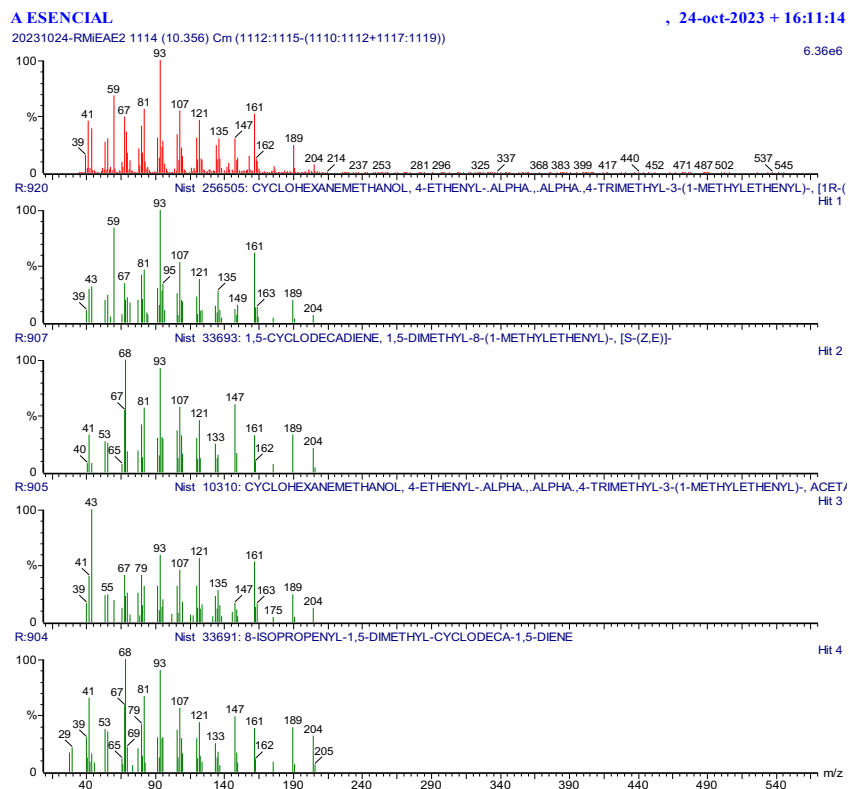


Figura 105. Espectro de masas del compuesto elemol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

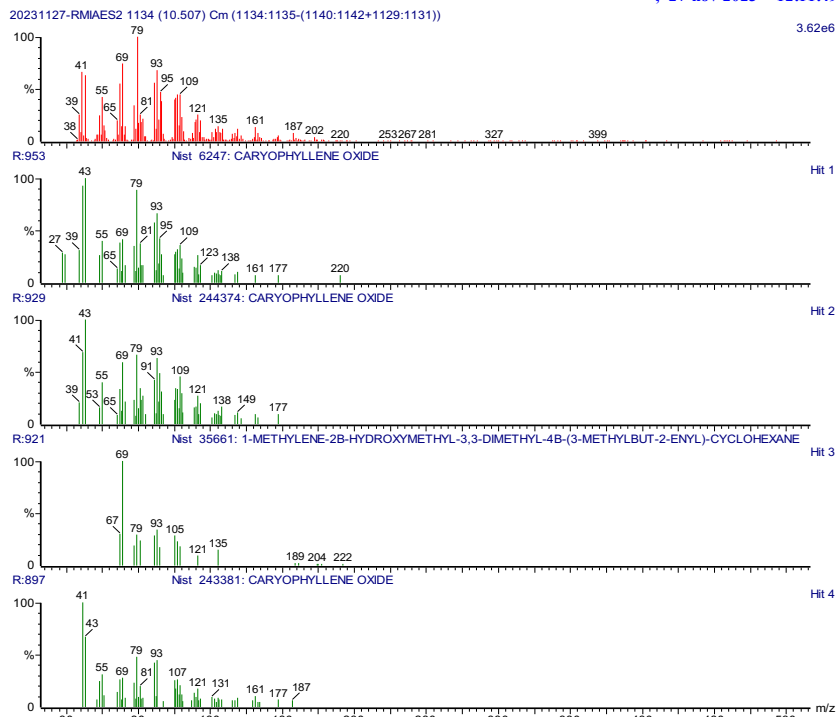


Figura 106. Especto de masas del compuesto óxido de cariofileno detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

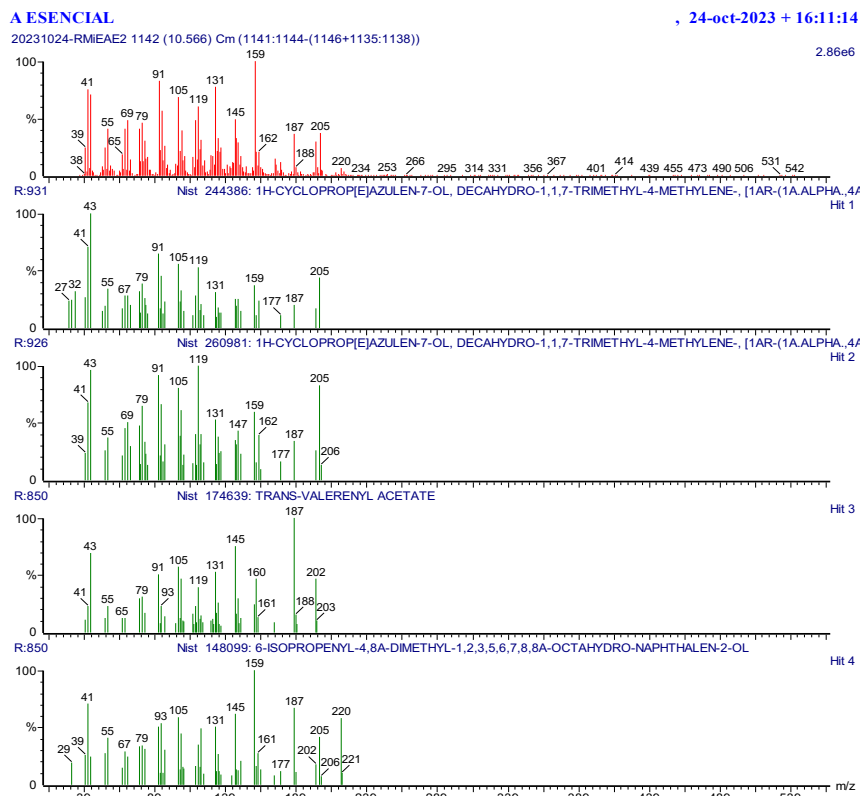


Figura 107. Especto de masas del compuesto espatuleno detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

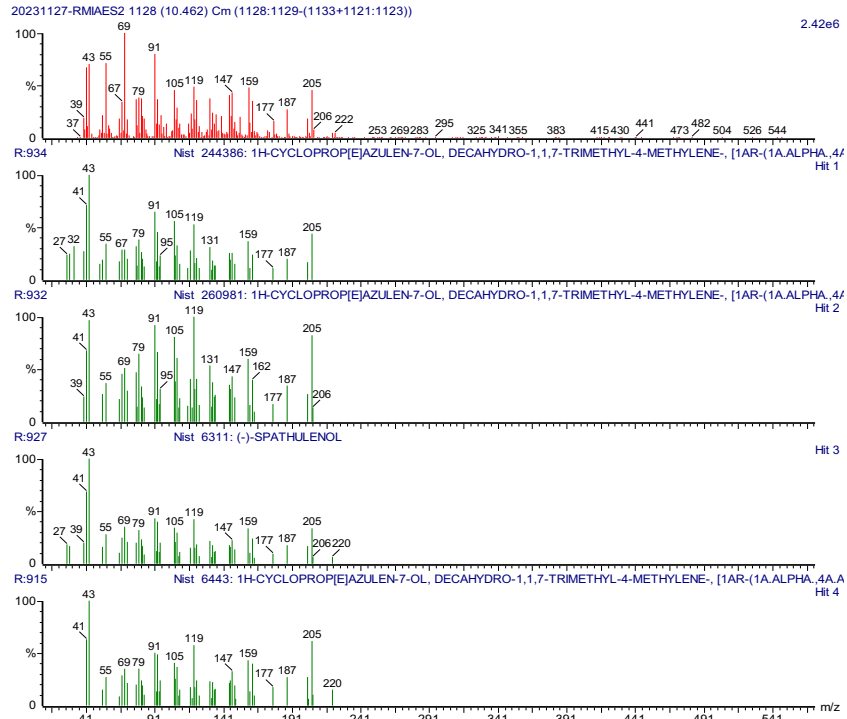


Figura 108. Especto de masas del compuesto espatulenol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

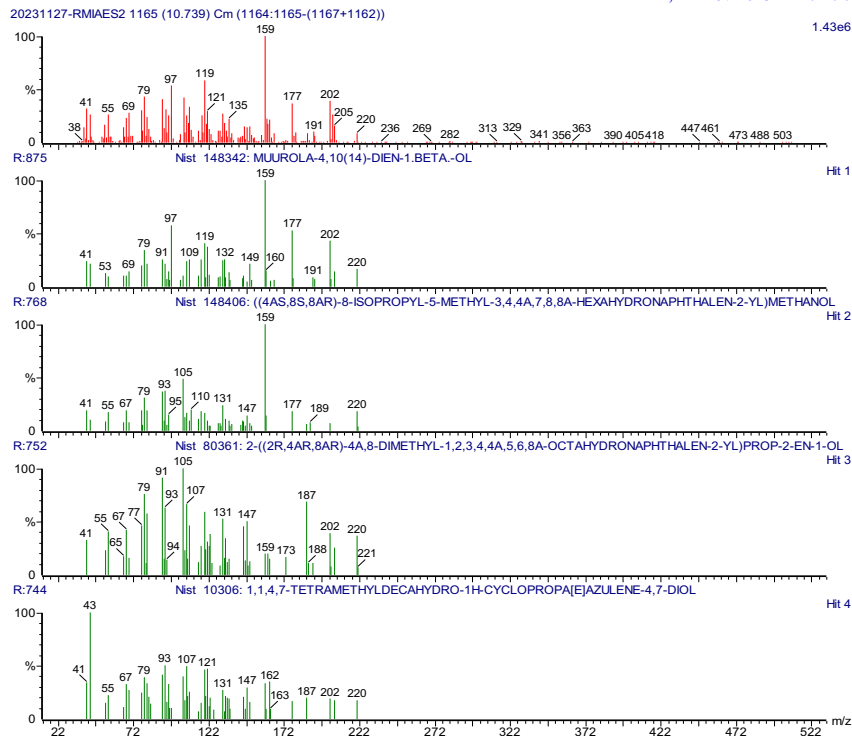


Figura 109. Especto de masas del compuesto β -murola-4,10(14)-dien-1-ol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

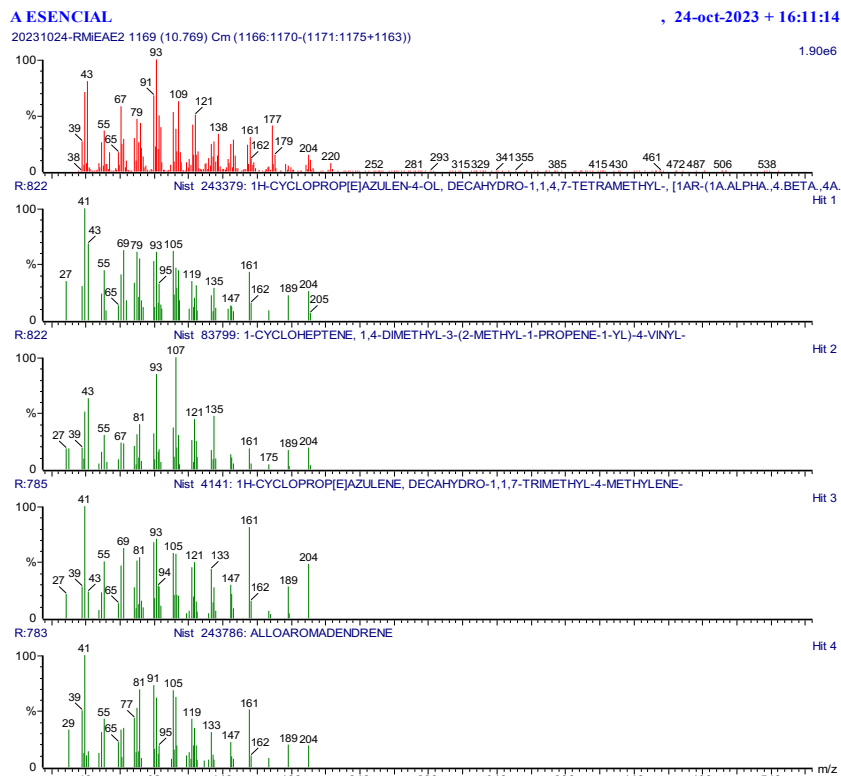


Figura 110. Especto de masas del compuesto óxido de humeleno II detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

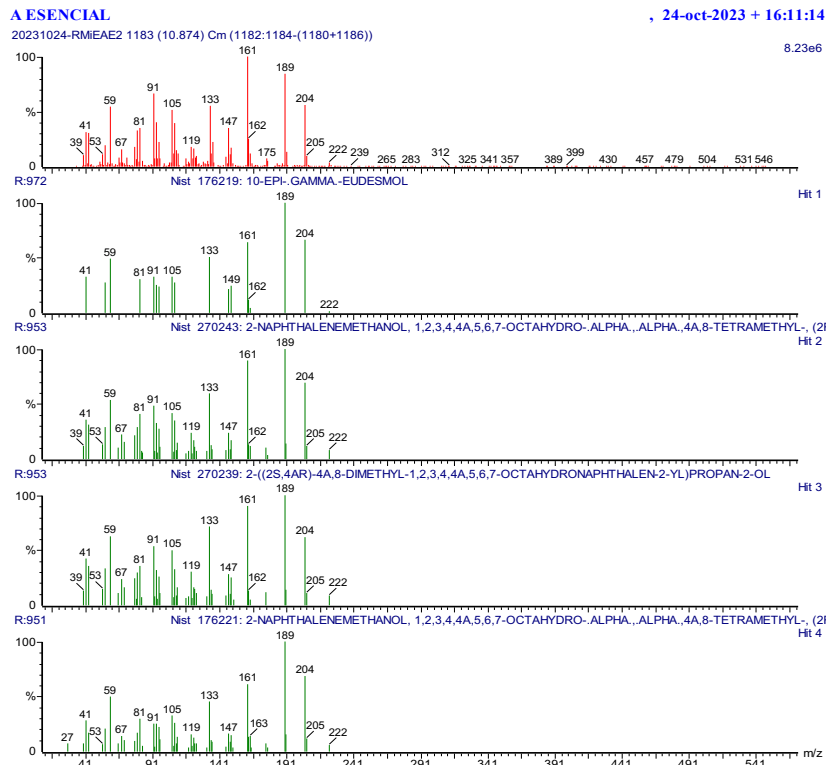


Figura 111. Especto de masas del compuesto γ -eudesmol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

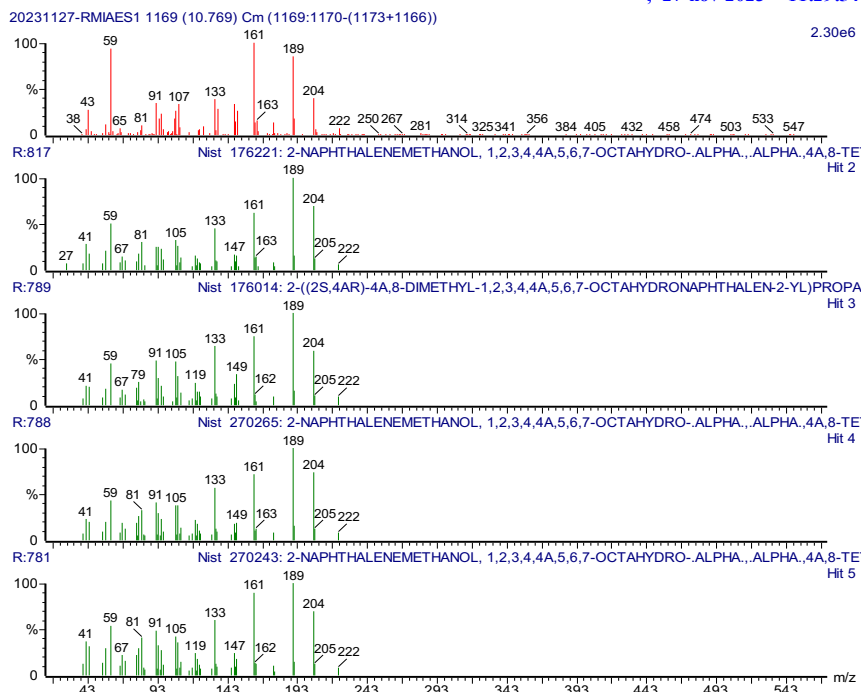


Figura 112. Especto de masas del compuesto γ -eudesmol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

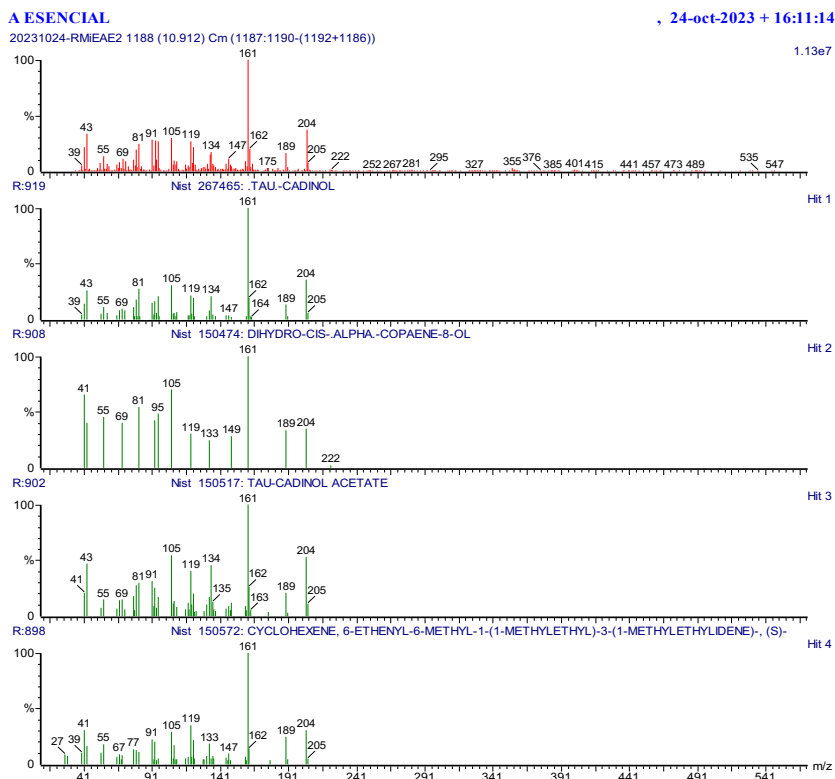


Figura 113. Especto de masas del compuesto τ -cadinol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

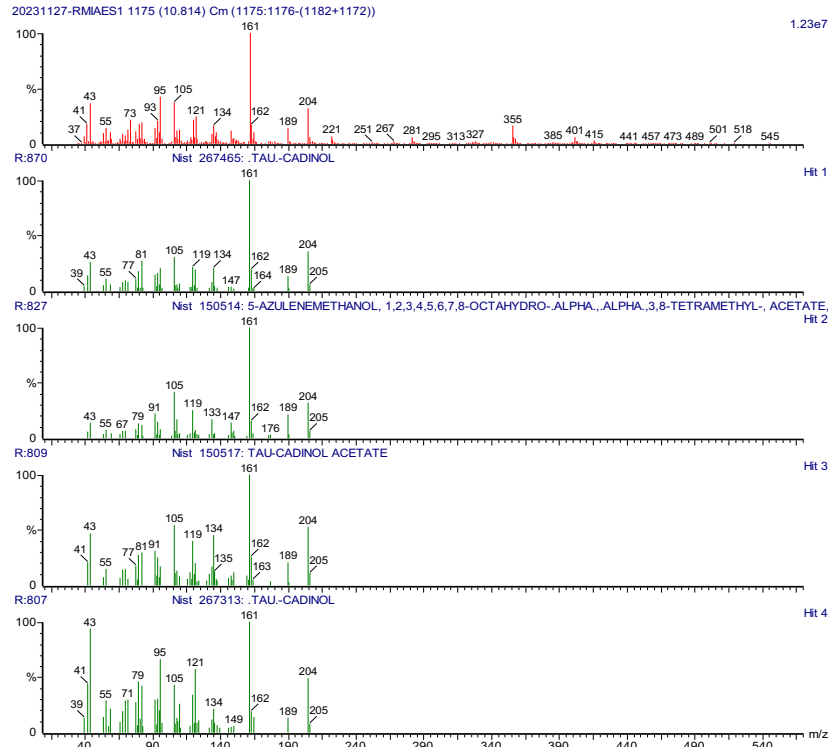


Figura 114. Espectro de masas del compuesto τ -cadinol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

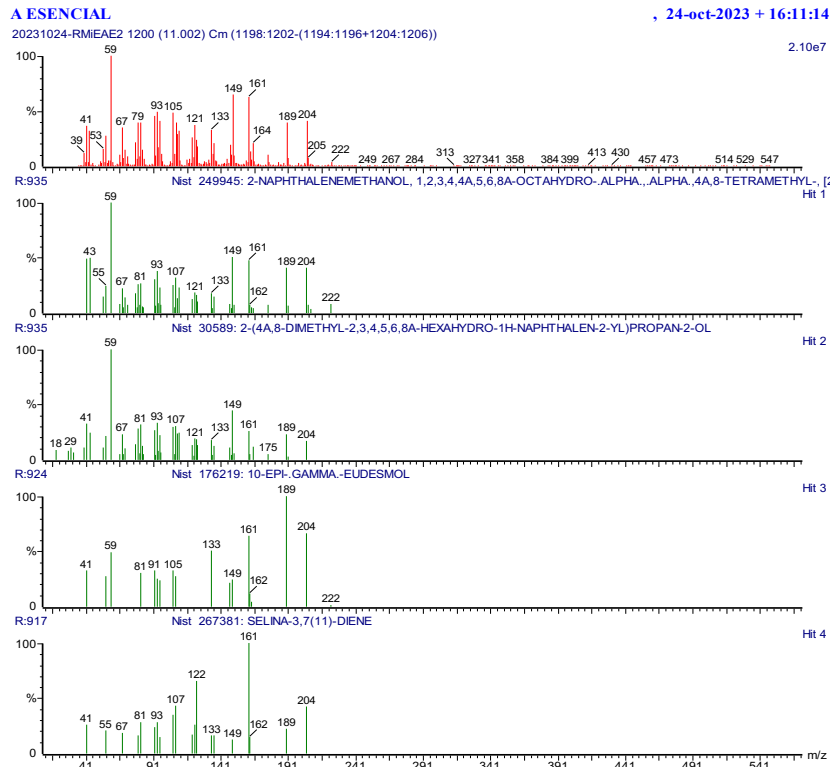


Figura 115. Espectro de masas del compuesto α -eudesmol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

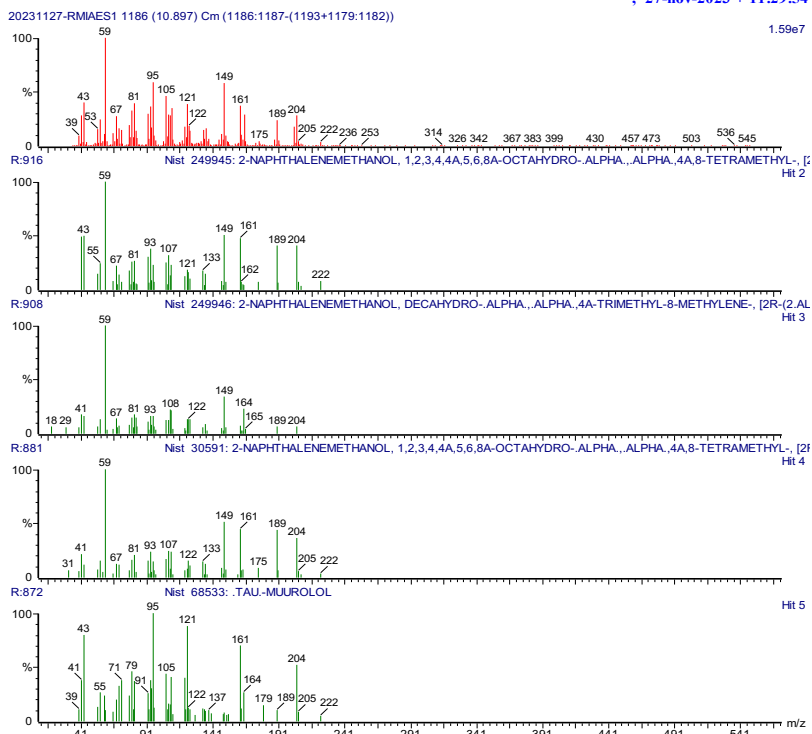


Figura 116. Especto de masas del compuesto α -eudesmol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

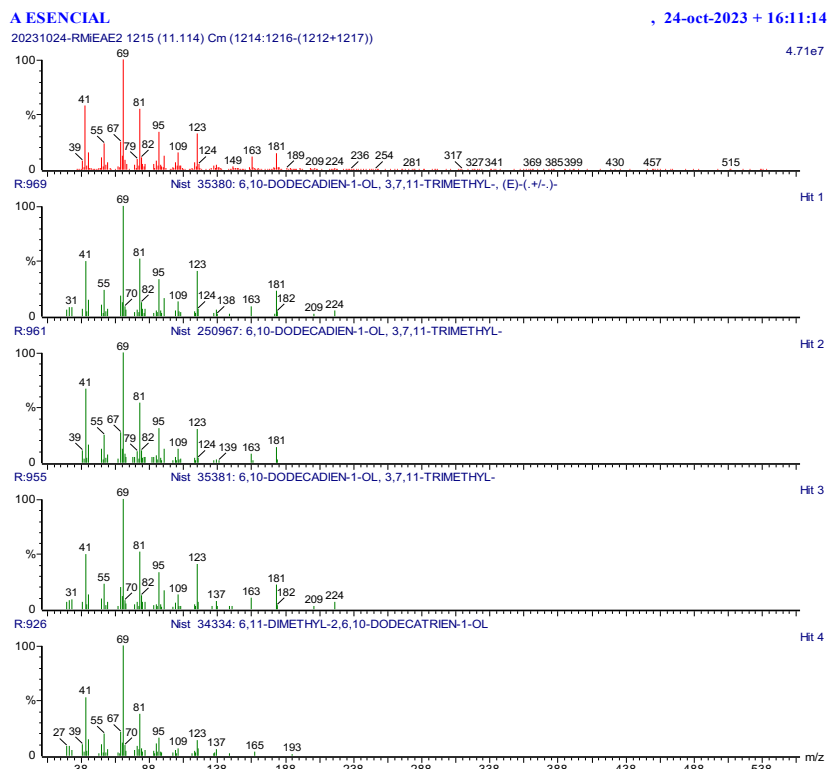


Figura 117. Especto de masas del compuesto 2,3-dihidrofarnesol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

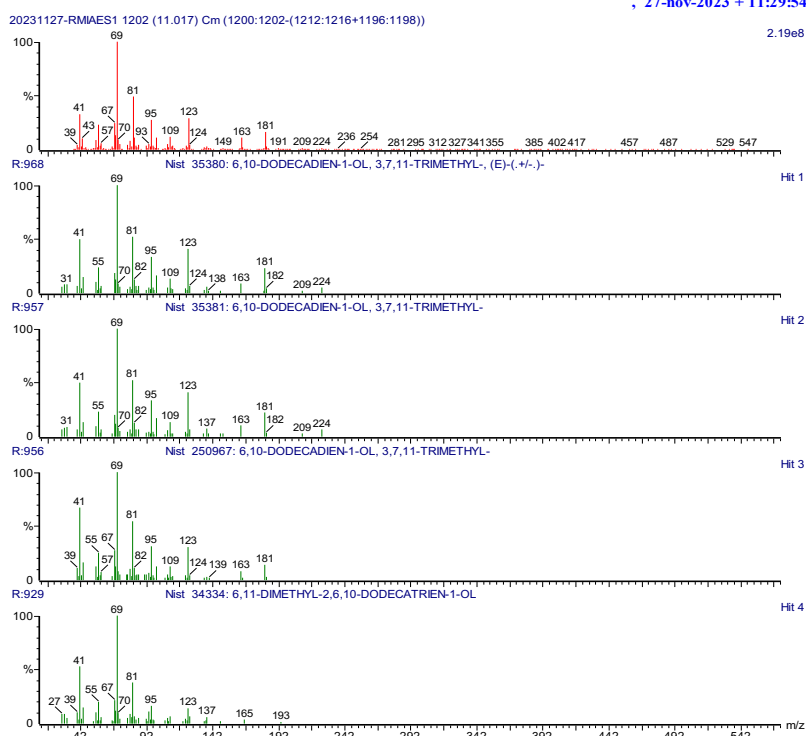


Figura 118. Especto de masas del compuesto 2,3-dihidrofarnesol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

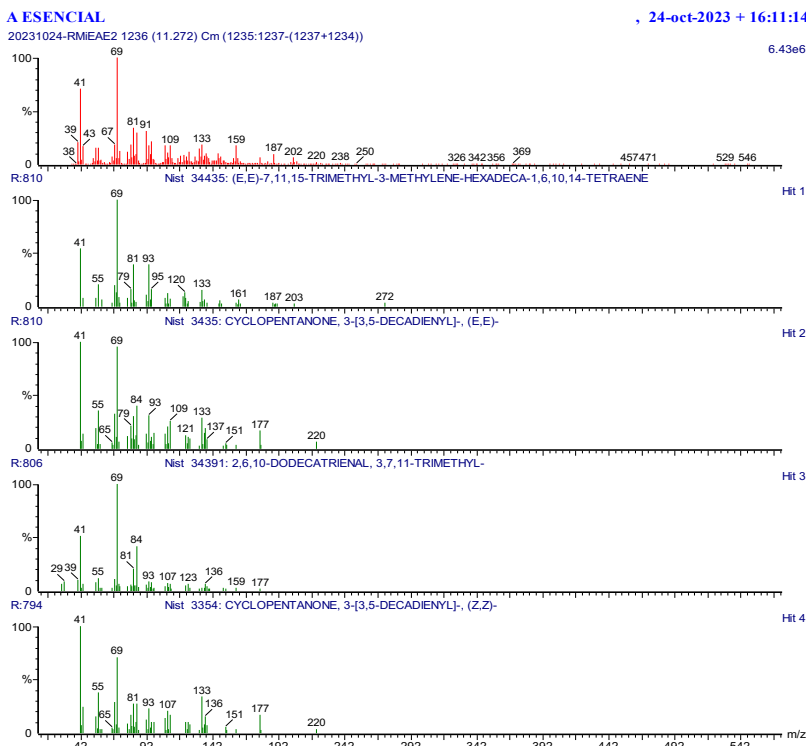


Figura 119. Especto de masas del compuesto (*E,E*)-farnesal detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

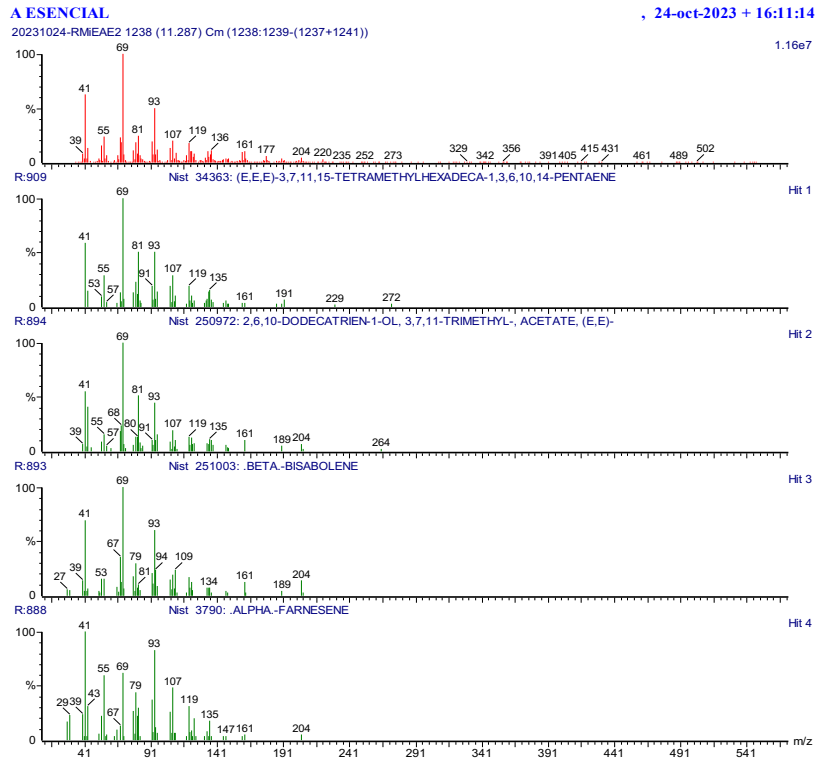


Figura 120. Especto de masas del compuesto farnesol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

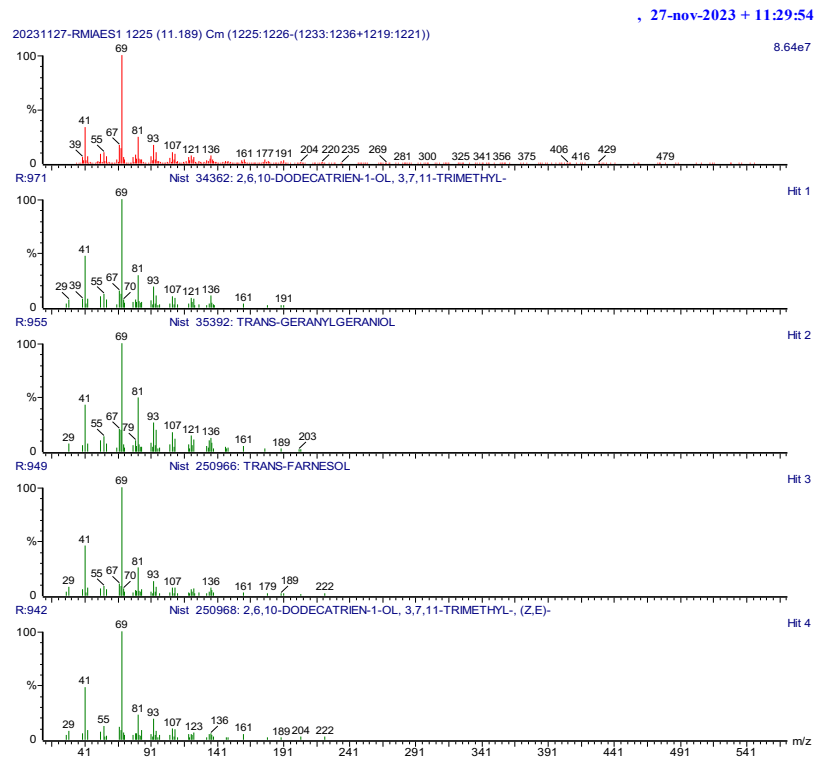


Figura 121. Especto de masas del compuesto farnesol detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

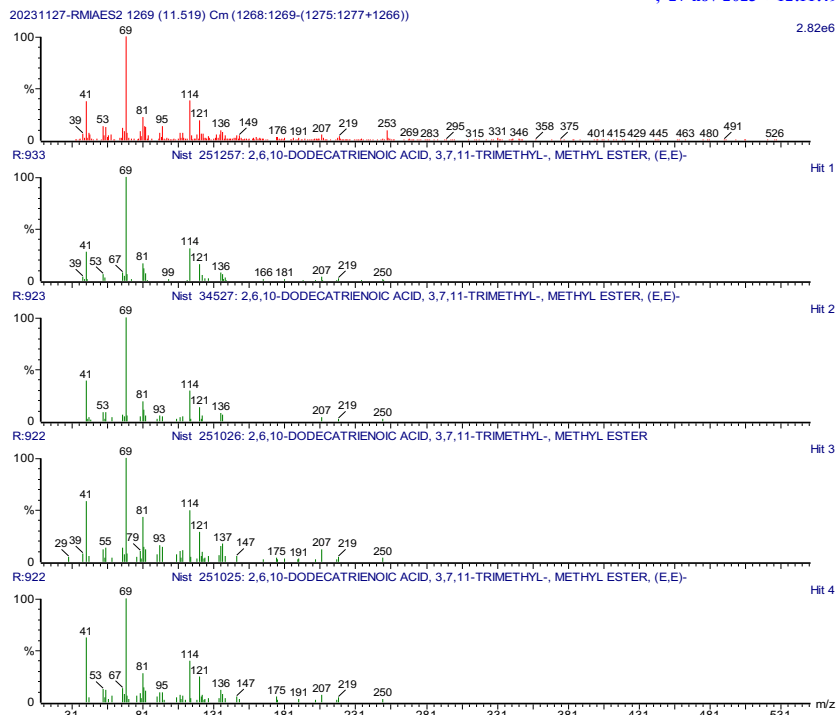


Figura 122. Espectro de masas del compuesto (2E,6E)-metil farnesoato detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

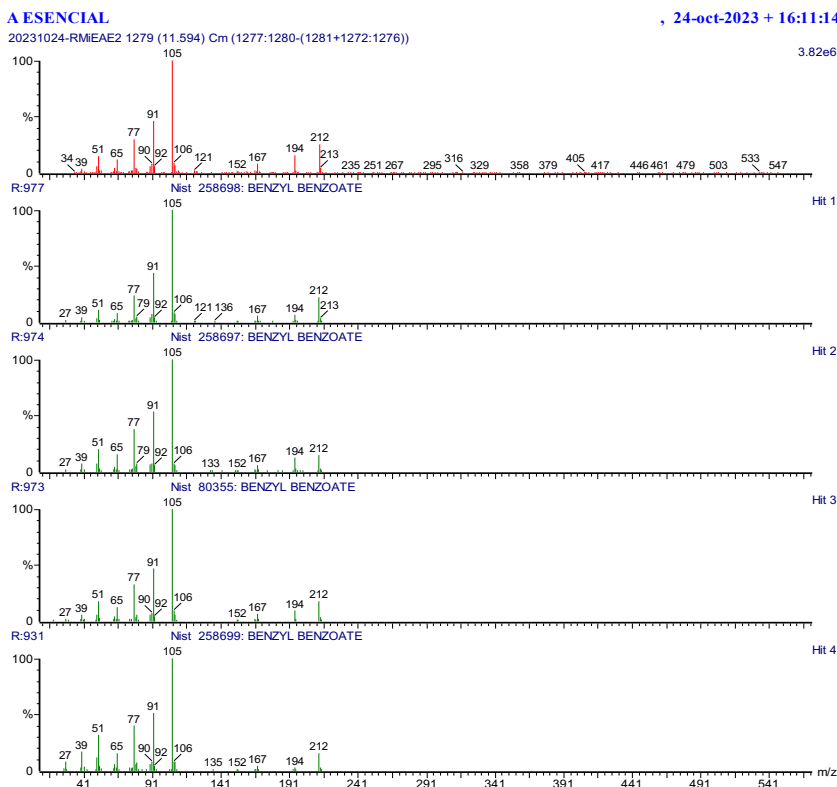


Figura 123. Espectro de masas del compuesto benzoato de bencilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

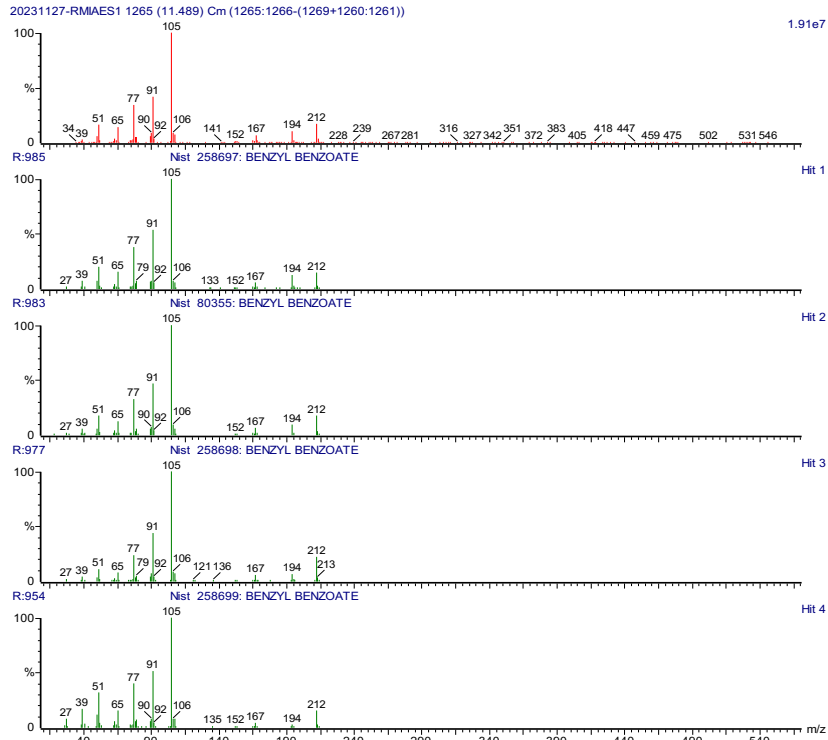


Figura 124. Espectro de masas del compuesto benzoato de bencilo detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

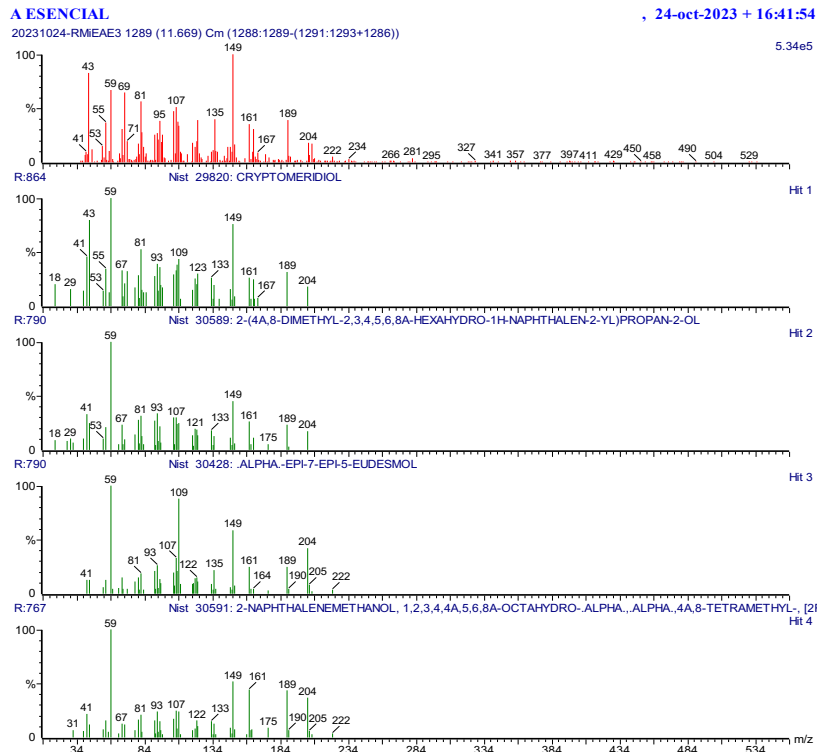


Figura 125. Espectro de masas del compuesto criptomeridiol detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

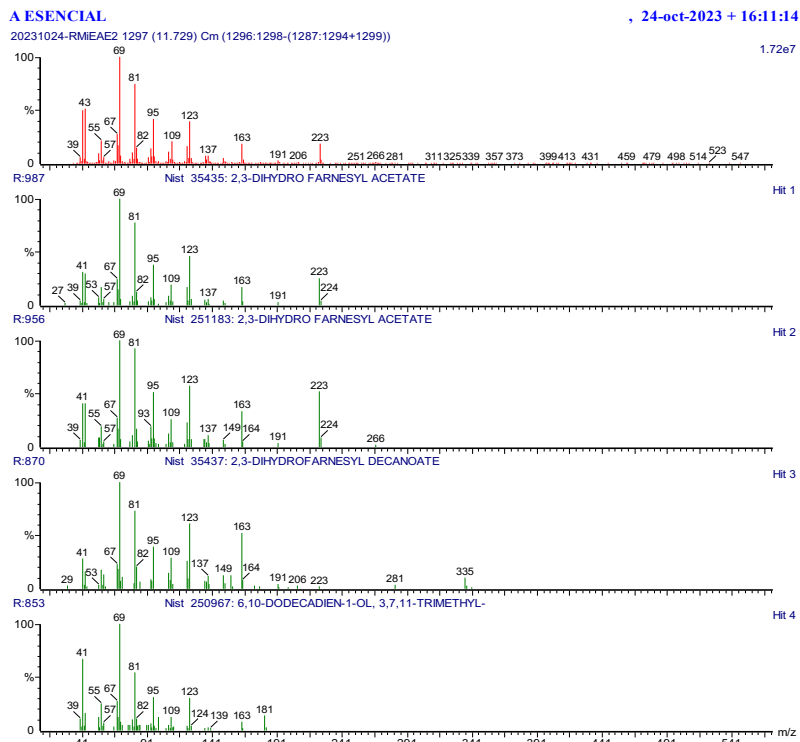


Figura 126. Espectro de masas del compuesto acetato de dihidrofarnesilo detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

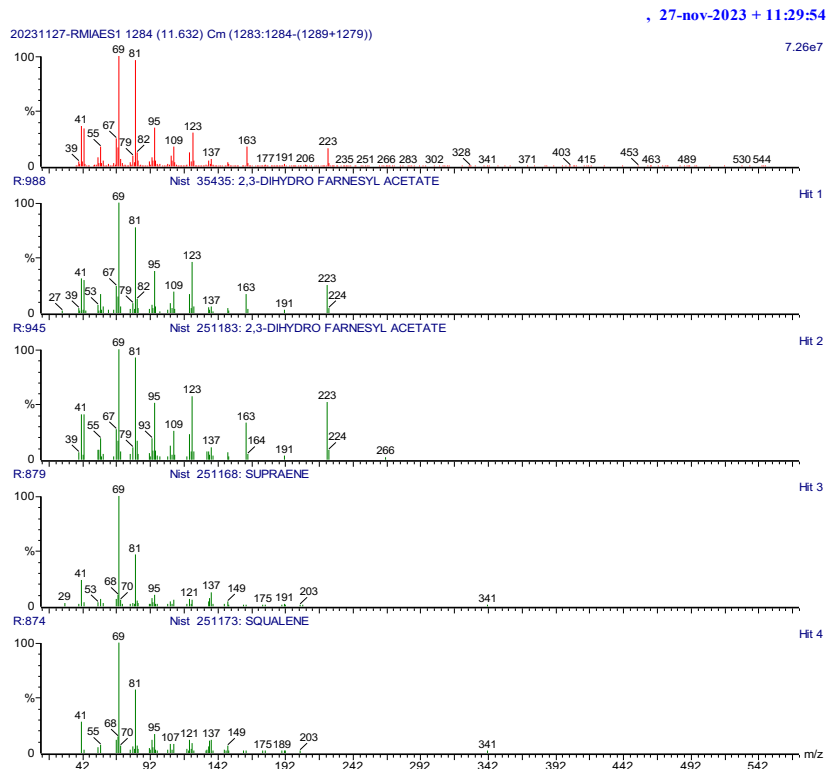


Figura 127. Espectro de masas del compuesto acetato de dihidrofarnesilo detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

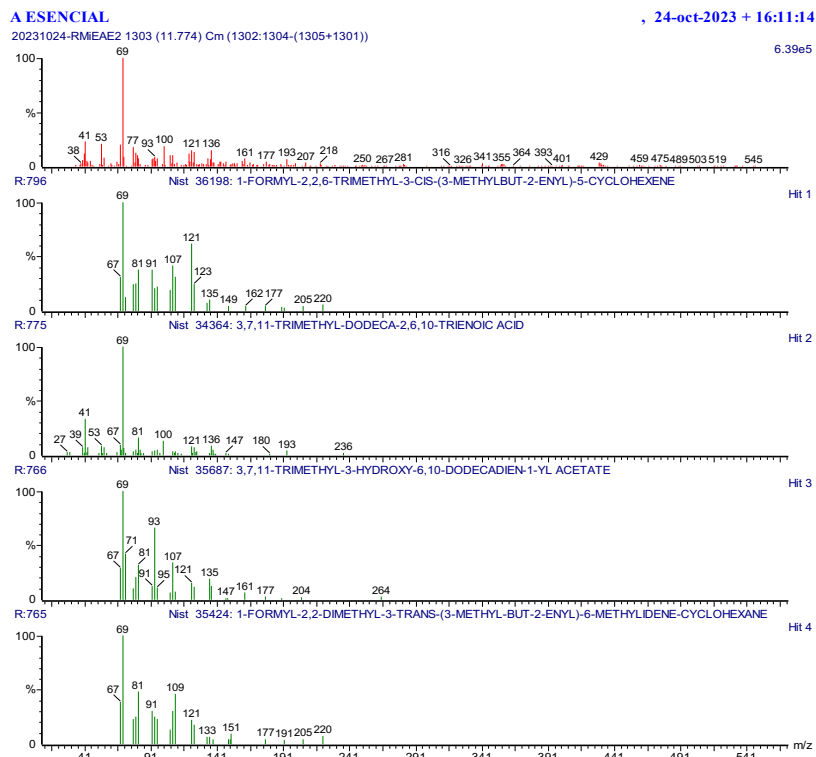


Figura 128. Especto de masas del compuesto ácido farnesoico detectado en el aceite esencial de planta fresca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

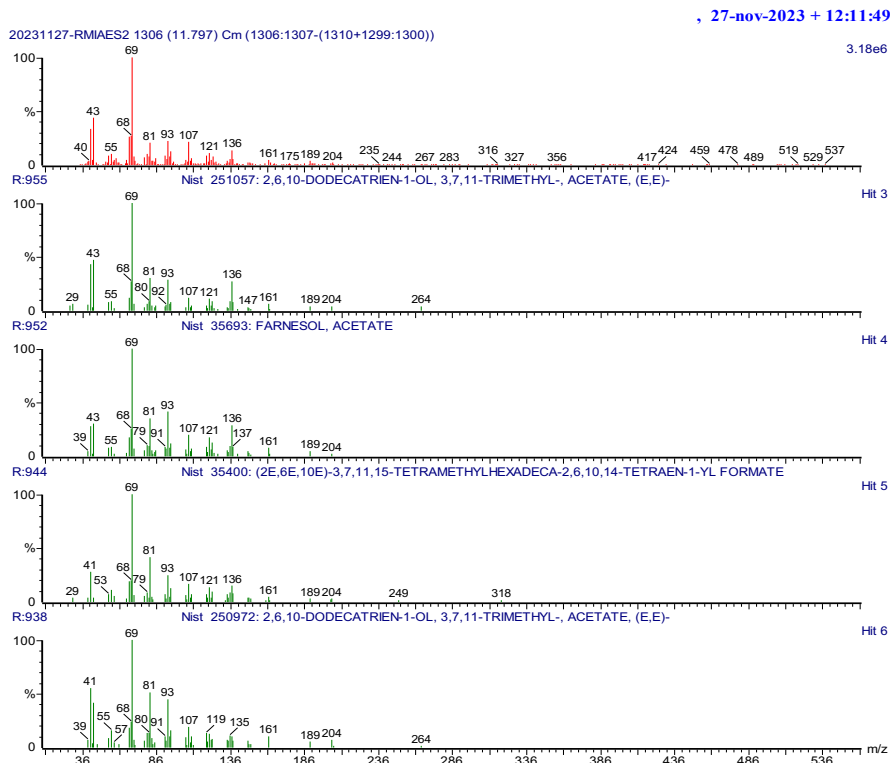


Figura 129. Especto de masas del compuesto acetato de farnesilo detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

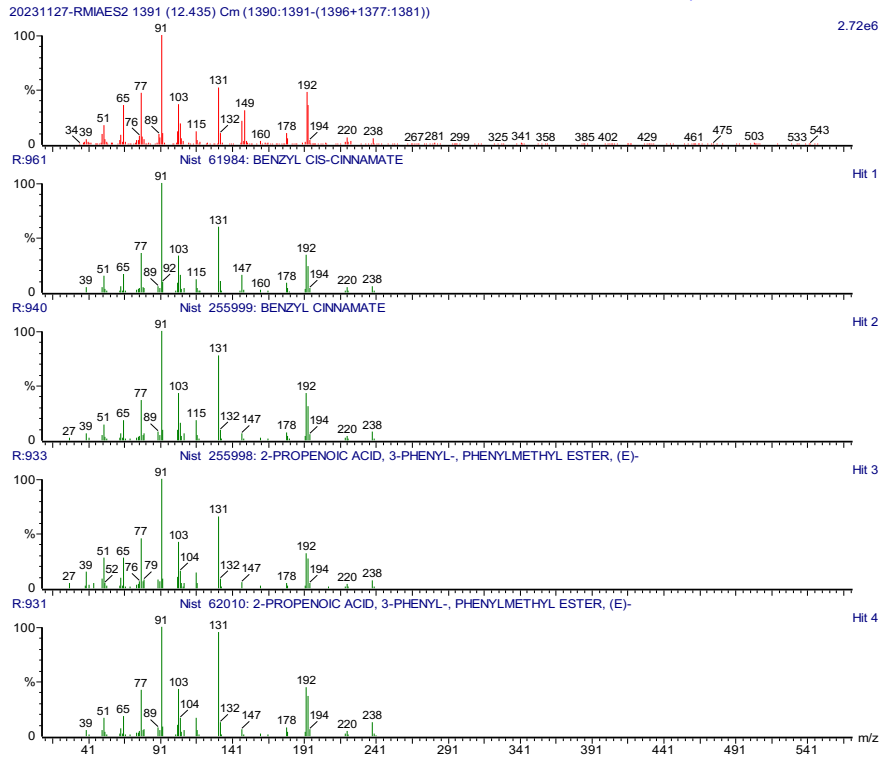


Figura 130. Espectro de masas del compuesto *cis*-cinamato de bencilo detectado en el aceite esencial de planta seca de *E. trichocalyx* por CG-EM.

Literatura citada

Aletaha, D. y Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*, 320(13),1360–1372. doi:10.1001/jama.2018.13103

Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Maldonado-Miranda, J.J., Castillo-Pérez, L.J., Carranza-Álvarez, C., Solano, E., Isiordia-Espinoza, M.A., Del Carmen Juárez-Vázquez, M., Zapata-Morales, J.R., Argueta-Fuertes, M.A., Ruiz-Padilla, A.J., Solorio-Alvarado, C.R., Rangel-Velázquez, J.E., Ortiz-Andrade, R., González-Sánchez, I., Cruz-Jiménez, G. y Orozco-Castellanos, L.M. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 198, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.038>

Areti, A., Komirishetty, P., Kalvala, A. K., Nellaiappan, K. y Kumar, A. (2018). Rosmarinic acid mitigates mitochondrial dysfunction and spinal glial activation in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Molecular neurobiology*, 55, 7463-7475. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0920-4>

Arifin, W. N. y Zahiruddin, W. M. (2017). Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 24(5), 101. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>

Argueta, A., Gallardo, V.M.C. e Instituto Nacional Indigenista (México). (1994). *Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana*. México, D.F: Instituto Nacional Indigenista.

Arriaga-Giner, F. J., Wollenweber, E., Schober, I., y Yatskievych, G. (1988). Three new benzoic acid derivatives from the glandular excretion of *Eriodictyon sessilifolium* (Hydrophyllaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43(5-6), 337-340. <https://doi.org/10.1515/znc-1988-5-603>

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B. y Dirsch, V. M. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

Batko, B., Rolska-Wójcik, P., y Władysiuk, M. (2019). Indirect costs of rheumatoid arthritis depending on type of treatment—a systematic literature review. *International journal of environmental research and public health*, 16(16), 2966. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162966>

Beutler, J. A. (2019). Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Current protocols in pharmacology*, 86(1), 9.11-9.11.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0911s46>

Bohm, B. A., & Constant, H. (1990). Leaf surface flavonoids of *Eriodictyon trichocalyx*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(7-8), 491–492. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(90\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90120-5)

Boone, C. H. T., Parker, K. A., Gutzmann, D. J., Atkin, A. L. y Nickerson, K W. (2023). Farnesol as an antifungal agent: comparisons among MTL_a and MTL_b haploid and diploid *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Physiology*, 14, 1207567 <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1207567>

Caballero, J., Cortés, L., Mapes, C., Blancas, J., Rangel-Landa, S., Torres-García, I., Farfán-Heredia, B., Martínez-Ballesté, A. y Casas, A. (2022). Ethnobotanical Knowledge in Mexico: Use, Management, and Other Interactions Between People and Plants. In: Casas, A., Blancas Vázquez, J.J. (eds) *Ethnobotany of the Mountain Regions of Mexico*. *Ethnobotany of Mountain Regions*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77089-5_2-1

Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Altavilla, D., Calatroni, A. (2003). Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther*, 5(3), R122-131

Casas, A., Blancas, Vázquez, J.J. y Vibrans, H. (2023). Perspectives of the Ethnobotanical Research in Mexico. In: Casas, A., Blancas Vázquez, J.J. (eds) *Ethnobotany of the Mountain Regions of Mexico*. *Ethnobotany of Mountain Regions*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-99357-3_57

Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), (2006). *Capital natural y bienestar social*.

Currie, G. M. (2018). Pharmacology, part 1: introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(2), 81-86. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199588>

Delmondes, G. de A., Santiago, L. I. C., Dias, D. de Q., Cunha, G. L. da, Araújo, I. M., Barbosa, R., Coutinho, H. D. M., Felipe, C. F. B., Barbosa-Filho, J. M., De Lima, N. T. R., De Menezes, I. R. A. y Kerntopf, M. R. (2020). Pharmacological applications of farnesol (C₁₅H₂₆O): a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(3), 227-234. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1718>

Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>

Diaz, D. P. P., Arias, C. T. y Joseph-Nathan, P. (1987). A chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and a C-methyl flavanone from the bark

of *Piper hostmannianum*. *Phytochemistry*, 26(3), 809-811.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84792-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84792-5)

dos Santos, C. R. B., Sampaio, M. G. V., Vandesmet, L. C. S., dos Santos, B. S., de Menezes, S. A., Portela, B. Y. M., Gomes, D. W. R., Correia, M. T. S., Gomez, M. C. V., De Alencar Menezes, I. R. y da Silva, M. V. (2022). Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves. *Natural Product Research*, 37(22), 3844–3850.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2151008>

Enkhmaa, G., Odontuya, G., Purevdorj, E., Nomin, M., Enkhjin, G., Chimgee, T., y Yeruult, C. (2023). Anti-oxidative, and Acute Toxicity Study of *Nepeta sibirica* L. *Natural Product Sciences*, 29(2), 74-84.
<https://doi.org/10.20307/nps.2023.29.2.74>

Eriodictyon trichocalyx A.Heller in GBIF Secretariat (2022). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> acceso via GBIF.org en 01-23-2023

Festing, M. F. (2006). Design and statistical methods in studies using animal models of development. *Ilar Journal*, 47(1), 5-14.
<https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.5>

Gandhi, G. R., Jothi, G., Mohana, T., Vasconcelos, A. B. S., Montalvão, M. M., Hariharan, G., Sridharan, G., Kumar, P. M., Gurgel, R. Q., Li, H. B., Zhang, J., Gan, R. Y. (2021). Anti-inflammatory natural products as potential therapeutic agents of rheumatoid arthritis: A systematic review. *Phytomedicine*, 93(153766).
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153766>

Ghasemzadeh Rahbardar, M., & Hosseinzadeh, H. (2020). Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(10), 1779-1795. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01935-w>

Guerrero-Solano, J. A., y Flores-Bazán, T. (2022). El granado (*Punica granatum* L.); un árbol ancestral con efecto analgésico y antinociceptivo. *Con-Ciencia Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 3*, 9(18), 23-27.

<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa3/article/view/9461>

INEGI (2019). Cuéntame de México. Esperanza de vida. Consultado el 17 de octubre, 2022, disponible en:
<https://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/esperanza.aspx?tema=P>

Irshad, M., Subhani, M. A., Ali, S. y Hussain, A. (2020). Biological Importance of Essential Oils. *IntechOpen*. 1, 37-40 doi: 10.5772/intechopen.87198

Isidorov, V. A., Vinogorova, V. T. y Rafałowski, K. (2003). HS-SPME analysis of volatile organic compounds of coniferous needle litter. *Atmospheric Environment*, 37(33), 4645–4650. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.07.005>

Iwanowicz-Palus, G., Polska, P., Polski, P., Świst, D., Zarajczyk, M. y Bień, A. (2019). Herbal medicine as an element that supports new technologies in medicine. *European Journal of Medical Technologies*, 2 (23), 1-6.

Jong, T. T. y Chau, S. W. (1998). Antioxidative activities of constituents isolated from *Pandanus odoratissimus*. *Phytochemistry*, 49(7), 2145-2148. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00390-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00390-2)

Jung, Y. Y., Hwang, S. T., Sethi, G., Fan, L., Arfuso, F., Ahn, K. S. (2018). Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. *Molecules*, 23(11),2827. <https://doi.org/10.3390/molecules23112827>

Kagansky, A., Malone, J.H., Mari-Baughn, V. J., Rummun, N. y Vidushi S. N. (2020). Harnessing the potential of plant biodiversity in health and medicine: opportunities and challenges. En D. Egamberdieva, M. Ozturk, y M. Pešić. (2020). *Biodiversity and Biomedicine: Our Future* (pp 43-51). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00003-7>

Khan, S., Sahar, A., Tariq, T., Sameen, A., y Tariq, F. (2023). Essential oils in plants: Plant physiology, the chemical composition of the oil, and natural variation of the oils (chemotaxonomy and environmental effects, etc.). *Essential Oils*, 1-36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91740-7.00016-5>.

Khare, S., Singh, N. B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R. K. y Amist, N. (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, 63, 203-2016. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09245-7>

Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. D. A., Bergamo, D. C. B., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. D. S., Furlan, M., Guimaraes, E. F., Young, M. C. M. y Kato, M. J. (2004). Benzoic acid derivatives from piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1783-1788. <https://doi.org/10.1021/np030530j>

Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>

Li, C.-L., Yu, Y., He, T., Wang, R.-R., Geng, K.-W., Du, R., Luo, W.-J., Wei, N., Wang, X.-L., Wang, Y., Yang, Y., Yu, Y.-Q. y Chen, J. (2018). Validating Rat Model of Empathy for Pain: Effects of Pain Expressions in Social Partners.

Frontiers in Behavioral Neuroscience, 12,1-16.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00242>

Li, J. y Chase, H. A. (2010). Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Natural Product Reports*, 27(10), 1493.
<https://doi.org/10.1039/c0np00015a>

Lima, M. da P., de Lucena, J. M. V. M., Alcântara, J. M., Soares, P. I. L., y Marques, M. O. M. (2023). Essential oils from branches of *Bocageopsis*, *Guatteria* and *Unonopsis* species: chemical composition and antibacterial activity. *Concilium*, 23(9), 355–362. <https://doi.org/10.53660/CLM-1291-23K30>

Lin Y-J, Anzaghe M, Schülke S. (2020). Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*, 9(4):880.
<https://doi.org/10.3390/cells9040880>

López-Vázquez, E. (2019). *Elaboración de fichas técnicas etnomédicas plurilingües enfocado en la flora nativa de Baja California, México*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. 86 pp.

Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54, 275-287. <https://doi.org/10.1007/BF01234480>

Mahapatra, A. D., Bhowmik, P., Banerjee, A., Das, A., Ojha, D. y Chattopadhyay, D. (2019). Ethnomedicinal wisdom: an approach for antiviral drug development. In *New look to phytomedicine* (pp. 35-61). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00003-3> Get rights and content

Maher, P., Fischer, W., Liang, Z., Soriano-Castell, D., Pinto, A. F. M., Rebman, J., Currais, A. (2020). The Value of Herbarium Collections to the Discovery of Novel Treatments for Alzheimer’s Disease, a Case Made With the Genus *Eriodictyon*. *Frontiers in Pharmacology*, 11(208), 1-9.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00208>

Manchope, M. F., Ferraz, C. R., Borghi, S. M., Rasquel-Oliveira, F. S., Franciosi, A., Bagatim-Souza, J., Dionisio, A. M., Casagrande, R. y Verri Jr, W. A. (2022). Chapter 38 - Therapeutic role of naringenin to alleviate inflammatory pain. In: Rajendram, R., Patel, V. B., Preedy, V. R. and Martin, C. R.(eds) *Treatments, Mechanisms, and Adverse Reactions of Anesthetics and Analgesics*, Academic Press, Pages 443-455, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820237-1.00038-7>.

Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A. y Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 108,1-142. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7_1

Matos Miranda, C. (2020). Plantas medicinales y su uso informal. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 5(2),47-8 DOI: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2020.52.170>

McInnes, I. B., y Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205-2219. <https://doi.org/10.1056/nejmra1004965>

McNamara C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33):13525-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>

Mesa-Vanegas, A. M. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 16-27. <https://www.redalyc.org?id=57956616003>

Mokhtarikhah, G., Ebadi, M.-T., y Ayyari, M. (2020). Qualitative changes of spearmint essential oil as affected by drying methods. *Industrial Crops and Products*, 153, 112492. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112>

Mondal, M., Quispe, C., Sarkar, C., Bepari, T. C., Alam. M. J., Saha, S., Ray, P., Rahim, M. B., Islam, M. T., Setzer, W. N., Salehi, B., Ahmadi, M., Abdalla, M., Sharifi-Rad, J. y Kundu, S. K. (2021). Analgesic and Anti-Inflammatory Potential of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Leaf: In Vivo and in Silico Studies. *Natural Product Communications*, 16(4). <https://doi.org/10.1177/1934578X211007634>

Montalvo, A.M., Riordan, E.C. y Beyers, J.L. (2017). Plant profile for *Eriodictyon trichocalyx*. Native Plant Recommendations for Southern California Ecoregions. Riverside-Corona Resource Conservation District and U.S. Department of Agriculture, Forest service, Pacific Southwest Research Station, Riverside, CA. <https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/57249>

Mould-Quevedo, J., Pelaez Ballestas, I., Vázquez Mellado, J., Terán Estrada, L., Esquivel Valerio, J.A., Ventura Ríos, L. y Aceves Ávila, F.J. (2008). El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México. *Gaceta Medica de Mexico*, 144 (3), 225-231. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4362641>

Nisar, B., Sultan, A. y Rubab, S. L. (2018). Comparison of Medicinally Important Natural Products versus Synthetic Drugs-A Short Commentary. *Natural Products Chemistry & Research*, 6(2), 1-2. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000308>

Ntalouka, F. y Tsirivakou, A. (2023). Luteolin: A promising natural agent in management of pain in chronic conditions. *Frontiers in Pain Research*, 4, 1114428. <https://doi.org/10.3389/fpain.2023.1114428>

Orjala, J., Wright, A. D., Behrends, H., Folkers, G., Sticher, O., Rügger, H. y Rali, T. (1994). Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of Natural Products*, 57(1), 18-26.

Palghadmal, S. B., Bhosale, R. K., Kulkarni, P. S., Kolhe, S., Yewale, S. y Padmanabhan, S. (2022). Use of Diaion HP20 Resin to Achieve High Rutin Containing *Moringa oleifera* Extract: Its Solubility and Anti-Bacterial Properties and Possible Applications in Nebulizer Formulation for COVID Patients. *Global Journal of Health Science*, 14 (10), 7. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v14n10p7>

Pino, J., Marbot, R., & Vazquez, C. (2005). Volatile constituents of genipap (*Genipa americana* L.) fruit from Cuba. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 583–586. <https://doi.org/doi:10.1002/ffj.1491>

Prasanth, K. G., Mathew, J. y Moku, W. (2015). Rosmarinic acid exerts protective effect on oxaliplatin induced peripheral neuropathy: Behavioral, neurophysiological and histopathological evidence. *European journal of pharmaceutical and medical research*, 9(4), 335 – 341 . https://www.researchgate.net/publication/359649944_ROSMARINIC_ACID_EXERTS_PROTECTIVE_EFFECT_ON_OXALIPLATIN_INDUCED_PERIPHERAL_NEUROPATHY_BEHAVIORAL_NEUROPHYSIOLOGICAL_AND_HISTOPATHOLOGICAL_EVIDENCE

Radu, A.F. y Bungau, S.G. (2021). Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*, 10(11), 1-33. <https://doi.org/10.3390/cells10112857>

Raimundo, K., Solomon, J. J., Olson, A. L., Kong, A. M., Cole, A. L., Fischer, A. y Swigris, J. J. (2019). Rheumatoid arthritis–interstitial lung disease in the United States: prevalence, incidence, and healthcare costs and mortality. *The Journal of rheumatology*, 46(4), 360-369. <https://doi.org/10.3899/jrheum.171315>

Ren, F. C., Wang, L. X., Lv, Y. F., Hu, J. M., y Zhou, J. (2020). Structure revision of four classes of prenylated aromatic natural products based on a rule for diagnostic ¹³C NMR chemical shifts. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(16), 10982-10990. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02409>

Rossato, M. F., Trevisan, G., Walker, C. I., Klafke, J. Z., de Oliveira, A. P., Villarinho, J. G., Zanon, R. B., Royes, L. F., Athayde, M. L., Gomez, M. V. y Ferreira, J. (2011). Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochemical pharmacology*, 81(4), 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.11.004>

Sahu, B. P., Gouda, P., & Patnaik, C. (2016). *Pandanus Odoratissimus* Linn: Isolation of stigmast-5, 22-dien-3 β -ol from ethanolic extract of stem bark and study of antimicrobial activity. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, 6(6), 574-585.

Sen, A. K., Sen, D. B. y Maheshwari, R. A. (2020). Extraction, Isolation, and Quantitative Determination of Flavonoids by HPLC. En: Sen, C. y Chakraborty, R. (Eds.) *Herbal Medicine in India*. Springer. (303-330).

Shima, K., Hisada, S. y Inagaki, I. (1972). サカキカズラの成分研究 (第 5 報) 2 種の新成分の単離とそれらの構造について. *YAKUGAKU ZASSHI*, 92(11), 1410-1414. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.92.11_1410

Solano, G. M. J., y Villalobos, Z. G. (2022). Principios básicos del abordaje del dolor. *Revista Ciencia Y Salud Integrando Conocimientos*, 6(1), 57–62. <https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v6i1.379>

Solomon, D. H. y Rudin, R. S. (2020). Digital health technologies: opportunities and challenges in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 16, 525-535. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0461-x>

Sorokina, M. and Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J Cheminform*, 12(20), 1-51. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00424-9>

Sun, Y., Wu, S., Fu, X., Lai, C. y Guo, D. (2022). De novo biosynthesis of τ -cadinol in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource and Bioprocessing*, 9, 29. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00521-7>

Teixeira JH, Silva AM, Almeida MI, Bessa-Gonçalves M, Cunha C, Barbosa MA, Santos SG. The Systemic Immune Response to Collagen-Induced Arthritis and the Impact of Bone Injury in Inflammatory Conditions. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 31;20(21):5436. <https://doi.org/10.3390/ijms20215436>

Terreaux, C., Gupta, M. P. y Hostettmann, K. (1998). Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper Dilatatum* in honour of Professor GH Neil Towers 75th birthday. *Phytochemistry*, 49(2), 461-464. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00197-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00197-6)

Trentham, D. E., Townes, A. S., Kang, A. H. (1977). Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med*, 146, 857-868.

Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., y Dinev, T. (2020). Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials. *Processes*, 8(10), 1222. <https://doi.org/10.3390/pr8101222>

Wang, M., Zhao, J., Avula, B., Lee, J., Upton, R., y Khan, I. A. (2023). Chemical characterization and quantitative determination of flavonoids and phenolic acids in yerba santa (*Eriodictyon* spp.) using UHPLC/DAD/Q-ToF. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115570. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115570>

Wilken-Robertson, M. (2012). An Ethnobotany of Baja California's Kumeyaay Indians. Tesis de Maestría. San Diego State University. 176 pp.

Wilken-Robertson, M. (2017). Kumeyaay Ethnobotany: Shared Heritage of the Californias: Native people and Native Plants of Baja California's Borderlands. Sunbelt Publications.

Winkelman, M. (1986). Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology*, 18(2), 109-131. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90024-3)

Xie, W., Xie, W., Jiang, C., Kang, Z., & Liu, N. (2023). Apigenin Alleviates Allodynia and Hyperalgesia in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy via Regulating Microglia Activation and Polarization. *Journal of Integrative Neuroscience*, 22(3), 64. <https://doi.org/10.31083/j.iin2203064>

Zhang, F., Fu, S., Xu, Q., Zhang, X., Xiao, H., & Liang, X. (2005). The Essential Oil of *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag (Asclepiadaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 630–631. <https://doi.org/doi:10.1080/10412905.2005>

Zhang, M., Zhao, J., Dai, X. y Li, X. (2023). Extraction and Analysis of Chemical Compositions of Natural Products and Plants. *Separations*, 10, 598. <https://doi.org/10.3390/separations10120598>

Zimdahl, R. L. (2018). CHAPTER 4 - Ethnobotany: Uses of Weeds. In: Zimdahl, R. L. (ed) Fundamentals of Weed Science. Elsevier Inc. pp.464

Zimmermann, M. (1983). The guidelines on ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain*, 16,109-110.